RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG DER ALPHA - UNTEREINHEIT VON GLYKOPROTEINHORMONEN

Ruth Gilch-Burger

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544313_0009

Aus der medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern

der Ludwig Maximilians - Universität München

Direktor: Prof. Dr. G. Paumgartner

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG DER ALPHA - UNTEREINHEIT VON GLYKOPROTEINHORMONEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Ruth Gilch - Burger

aus

München

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität

München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. K. Mann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Paumgartner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	19.6.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Radioimmunoassay für die α-Untereinheit von Glykoproteinhormonen wurde entwickelt. Die Primärimmunisierung von Kaninchen mit hCG-α (CR 117α), emulgiert in Paraffinöl und inkomplettem Freund'schem Adjuvans, ergab ohne Boosterung ein Antiserum mit ausreichendem Titer (1:1450) und vergleichsweise hoher Spezifität. Die maximale spezifische Bindung betrug 88%. Die radioaktive Markierung von ^{125}I-hCG-α nach der Chloramin-T- und der Iodo-Gen^{TM}-Methode ergab bezüglich spezifischer Aktivität (147 uCi/ug und 162 uCi/ug) und Stabilität des Tracers vergleichbare Ergebnisse. Die Reinigung des Tracers an Biogel-P-6 und nachfolgend an Concanavalin A-Sepharose mit der Abtrennung von störenden Substanzen mit verändertem Kohlehydratanteil erwies sich im Vergleich zur gelchromatographischen Nachreinigung als vorteilhaft; es wurde so eine Steigerung der spezifischen Bindung erreicht. Die Spezifität des Antiserums wurde mit den Antiseren Anti-hCG-α (RSL), Anti-TSH-α (NIAMDD), Anti-hCG-α (NIAMDD) und Anti-hCG-α (Paesel) verglichen. Folgende Kreuzreaktionen mit den dimeren Hormonen wurden ermittelt: hCG (CR 115) 6,4%, TSH (Paesel) 2,6%, TSH (RP-1) 27.0%, TSH (Calbiochem) 8,2%, LH (68/40) 5.5%, LH (Biodata 7,4%, LH (LER 960) 7,1%, LH (Calbiochem) 6,7% und FSH (HS 1) 4,2%. Die Spezifität war mit der des Antiserums Anti-hCG-α (Paesel) vergleichbar und höher als die der übrigen überprüften Antiseren. Die Sensivität des RIA betrug 0,11±0,14 ug/l (N=35), der Variationskoeffizient in der Serie 4%, der Variationskoeffizient von Tag zu Tag in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration 8,7, 18,9 und 16,7% (N=7) und die Wiederfindungsrate 97,2±8,3% (N=6). Die Parallelität zwischen gereinigten Präparationen von hCG-α und Serienverdünnungen von Seren mit hohem Gehalt der α-Untereinheit wiesen auf die weitgehende immunogene Ähnlichkeit beider Antigene hin.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. MATERIAL

2.1. Antiseren
2.2. Hormonpräparate
2.3. Reagenzien
2.4. Geräte und Hilfsmittel
2.5. Pufferlösungen

3. METHODEN

3.1. Radioaktive Markierung von hCG-α mit NaI-125

3.1.1. Prinzip
3.1.2. Markierungsreaktion
3.1.3. Trennung des markierten hCG-α vom ungebundenen Jodid
3.1.4. Rechromatographie des markierten hCG-α
3.1.5. Versuche zur Tracerreinigung
3.1.6. Stabilität des hCG-α Tracers

3.2. Antiseren

3.2.1. Immunisierung
3.2.2. Lagerung der Antiseren
3.2.3. Titerbestimmung

3.3. Präzipitierendes Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antiserum

3.4. Reaktionsbedingungen

3.5. Durchführung des Radioimmunoassays

3.5.1. hCG-α Radioimmunoassay
3.5.2. hCG- und LH- Radioimmunoassay
3.5.3. hCG-β Radioimmunoassay

3.6. Auswertung des Radioimmunoassays

3.7. Kreuzreaktionen

3.7.1. Methodik
3.7.2. Vergleich der Steigung der Verdünnungskurven
3.7.3. Chromatographische Reinigung verschiedener Hormonpräparationen

4. ERGEBNISSE

4.1. Radioaktive Markierung und Reinigung von hCG-α

4.1.1. Spezifische Aktivität
4.1.2. Chromatographie des Markierungsproduktes
4.1.3. Tracerreinigung
4.1.4. Stabilität des markierten hCG-α

4.2. Antiseren

4.2.1. Titerbestimmung
4.2.2. Lagerung der Antiseren

4.3. Reaktionsbedingungen

4.3.1. Tracerinkubation
4.3.2. Präzipitation mit dem Doppelantikörper
4.3.3. Verhältnis der Konzentration von Doppelantikörper und stabilisiertem Kaninchenserum
4.3.4. Inkubationsvolumen und Proteingehalt
4.3.5. Kalte Vorinkubation
4.3.6. Empfindlichkeit des hCG-α Radioimmunoassays

4.4. Methodische Ergebnisse

4.4.1. Standardverdrängungskurven

4.4.2. Kenndaten des hCG-α Assays

4.4.3. Qualitätskontrolle

4.4.3.1. Präzision

4.4.3.2. Richtigkeit

4.5. Spezifität

4.5.1. Unspezifische Einflüsse

4.5.2. Kreuzreaktionen

4.5.2.1. Ergebnisse

4.5.2.2. Chromatographische Reinigung verschiedener Hormonpräparationen

4.5.2.3. Vergleich der Steigung der Verdünnungskurven

4.6. Stabilität von hCG-α im Serum

5. DISKUSSION

6. LITERATUR

1. EINLEITUNG

Menschliches Choriongonadotropin (hCG) ist ein Glykoproteinhormon, das überwiegend vom Synzytiotrophoblast der Plazenta gebildet wird (1,20,56,66,70). Es besteht ebenso wie die anderen Glykoproteinhormone Lutropin (LH), follikelstimulierendes Hormon (FSH) und thyreoideastimulierendes Hormon (TSH) aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen, α und β genannten Untereinheiten (44,62,65). Während die β-Ketten die biologische und immunologische Spezifität der Hormone bestimmen, sind die α-Ketten strukturell annähernd gleich und immunologisch nicht zu unterscheiden (50,65). Experimentell können sie ohne Verlust der biologischen und immunologischen Aktivität zwischen den Glykoproteinhormonen ausgetauscht werden (1,4,45,47,63). In isolierter Form besitzen die hCG Untereinheiten keine biologische Aktivität (8,67). Hierzu muß das intakte glykosilierte Hormon vorliegen (4). Voraussetzung für die volle biologische Aktivität ist aber auch die Unversehrtheit des C-terminalen Endes der α-Kette (42), wodurch wahrscheinlich die Konformation des Hormons, die für die volle Funktion von Bedeutung ist, mitbeeinflußt wird.

Tab. 1: Molekulargewicht und Aminosäurezahl der Glykoproteinhormone im Vergleich (21)

	hCG	LH	FSH	TSH
α-Kette	92	89	89	96
β-Kette	147	115	111 - 115	113
MW	37900	26000	22000 - 27300	24000 - 28000

Tab. 2: Eigenschaften von hCG und seinen Untereinheiten (2,3,4,21,40,45)

Eigenschaft	hCG	hCG-α	hCG-B
Molekulargewicht +	38000	15000	23000
%Kohlehydrat	33	33	33
Anzahl der Aminosäuren	239	92	147
Anzahl der Zuckerreste	57-65	22-26	35-39
Anzahl der Kohlehydrateinheiten	7	2	5
Biologische Aktivität IU/mg++	11000		
%Bindungsaktivität	100		
%Immunologische Aktivität	100	1-2	10

+Bestimmt aus der Aminosäuresequenz und der Kohlehydratzusammensetzung der α - und B-Kette

++Bestimmt mittels Bioassay

Untersuchungen von Benveniste erbrachten 1975 Hinweise, daß die α-Untereinheit in der menschlichen Hypophyse in freier Form vorkommt (5), wobei sie hier offensichtlich in zwei verschiedenen Speichern vorliegt (34). Die Freisetzung aus dem größeren Pool, der sich den Gonadotropinen zuordnen läßt (34), kann durch LHRH stimuliert (5,24,34) und durch Östrogene gehemmt werden (34). Die Sekretion von hypophysär gespeicherter α-Untereinheit kann aber auch durch Gabe von TRH freigesetzt (34), bzw. durch Schilddrüsenhormon oder Glukokortikoide vermindert werden (34). Dies spricht dafür, daß die α-Untereinheit direkt hypophysär sezerniert wird und nicht ein Degradationsprodukt peripher metabolisierter Glykoproteinhormone darstellt (14,15).
Beide Untereinheiten, α und B, werden durch verschiedene mRNA's gesondert codiert (41), wobei meist die Bildung der B-Kette den entscheidend geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (11,32,66).

Das intakte Hormon entsteht durch Assoziation der beiden Untereinheiten (22). Die Hypothese von der Bildung eines hochmolekularen Propeptids (48) wurde inzwischen wieder verlassen.
Physiologischerweise leicht erhöhte Spiegel von hCG-α im Serum konnten bei Frauen zum Zeitpunkt der Ovulation (36,51), in der Schwangerschaft (19,20) und in der Postmenopause (7,24,32,33,35, 51), selten aber auch in der Prämenopause und bei Männern (32, 33) nachgewiesen werden. Nicht tumorös bedingte, leicht erhöhte Serumspiegel sind bei Patienten mit Hypothyreose (32), Hypophysenadenom (33,53), primärem Hypogonadismus (33,48) und Niereninsuffizienz (25,33) beschrieben. Daneben liegen Berichte von der ectopen Produktion der gemeinsamen placentaren-hypophysären α-Kette bei nicht-trophoblastischen Tumoren und beim Chorioncarcinom der Frau (57) vor (Magencarcinoid 55, Inselzellcarcinom 30, Mammacarcinom 11,9, Bronchialcarcinom 25, Harnblasencarcinom 31). Mac Farlane (36) berichtet von einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit bei Frauen mit metastasierendem malignen Melanom und erhöhtem hCG-α Gehalt. Braunstein (7) und Dosogne-Guérin (11) konnten jedoch nur selten ausreichend hohe, klar abgrenzbare tumorbedingte hCG-α Konzentrationen im Serum nachweisen. Zudem konnte nur selten eine Korrelation zwischen Tumorverlauf und Hormonspiegel hergestellt werden.
Als Hauptbildungsort von hCG-α in der Plazenta wurde der Zytotrophoblast wahrscheinlich gemacht. Die hCG Bildung ist bei malignen trophoblastischen Tumoren synzytiotrophoblastären Elementen zuzuordnen (40). Umfang und Ort der Sekretion der α-Kette ist dagegen noch wenig untersucht (maligne Hodentumoren 11, 29). Die Voraussetzung für diese Fragestellung ist eine ausreichend spezifische Nachweismethode.
Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine spezifische und sensitive radioimmunologische Bestimmungsmethode für die α-Untereinheit des hCG zu entwickeln und mit anderen in der Literatur angegebenen RIA's zu vergleichen.

2. MATERIAL

2.1. Antiseren

Anti-hCG-α (A), Lot. Nr. 44	Radioassay Systems Laboratories (RSL) Kalifornien, Vertrieb Fa. Biosigma, München
Anti-Human-TSH-α subunit (C)	National Pituitary Agency, Baltimore, Maryland (NIAMDD)
Anti hCG-α -subunit (D)	National Pituitary Agency, Baltimore, Maryland (NIAMDD)
Anti-hCG-α Kaninchen (F) Kat.Nr. 24-I-511	Paesel, Frankfurt
hCG-α	Serono, Freiburg
Anti-hCG-B AS 16	Institut National des Radioéléments Fleurus, Belgien, Reuter et al. 1974
Anti-hCG-B, Lot.Nr. 2333	Serono, Freiburg
Primogonyl® (hCG)	Schering, Berlin

2.2. Hormonpräperate

hCG (CR 115)	National Pituitary Agency (NIAMDD), Baltimore, Maryland
hCG-B (CR 115B)	
hCG-α (CR 117 α)	
hTSH (RP 1)	
hFSH (HS 1)	
hLH (LER 960)	
TSH Lot. Nr. 860129	Calbiochem, San Diego, Kalifornien

TSH-α Lot. Nr. 420022	Vertrieb Lahn Deutschland
LH Lot. Nr. 389467	
LH-β Lot. Nr. 389563	
LH-α Lot. Nr. 389532	
LH Lot. Nr. E621/B	Biodata, Rom, Italien
TSH Kat. Nr. 24-I 001	Paesel, Frankfurt/Main
LH 68/40	WHO, Vertrieb International
2nd hCG Standard IRP	Laboratory for Biological Standards and Control, Holly Hill, Hampsteadt, London, England

2.3. Reagenzien

Iodo-Gen™	Pierce Eurochemie Rotterdam, Niederlande
Biogel-P-6, Kat.Nr. 1500750	Bio-Rad München
P-60, Kat.Nr. 1501640	
Ultrogel-AcA-44	LKB, Bromma, Schweden
Sephadex SP-C-25, Lot.Nr. 13643	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Concanavalin-A-Sepharose	
Stabilisierendes Kaninchenserum	Serva Heidelberg
Methyl-alpha-D-Glucopyranosid	
Silikonlösung	
Glaswolle, reinst, silikonisiert	
Rinderserumalbumin	Carl Roth, Karlsruhe
Inkomplettes Freund'sches Adjuv.	Difco Laboratories, Detroit, USA
Natrium ^{125}Jodid	Behringwerke, Marburg, Lahn
steriles Paraffinöl	Universitätsapotheke der LMU
steriles NaCl, 0,9 %	München
Kaliumphosphat KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	
Natriumchlorid NaCL	
Natriumazid NaN_3	
Glycin	
Kaliumjodid KJ	

Chloramin-T

$Na_2S_2O_5$

Na EDTA

Chloroform

2.4. Geräte und Hilfsmittel

Polystyrolröhrchen,Vol. 4 ml	Greiner, München
Eppendorf Reaktionsgefäße,	Nethler und Hinz, Hamburg
Pasteurpipetten 150 mm	WU, Mainz
Taumelmischer	Cenco Instrumente, Breda, Niederld.
Pumpe, 2120, Varioperplex II	LKB, Bromma, Schweden
Fraktionssammler für Eppendorfketten 2112, Redirac	
Zentrifuge 4121, Varifuge S	Heräus-Christ, Osterode
Gammazählgerät	Prof. Dr. Berthold, Karlsruhe

2.5. Pufferlösungen

A: 0,4 mol/l KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, pH 7,5

B: 0,05 mol/l KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, pH 7,5
0,1 mol/l NaCl

C: 0,05 mol/l KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, pH 7,5
0,1 mol/l NaCl
1 g/l Rinderserumalbumin

D: 0,05 mol/l KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, pH 7,5
0,1 mol/l NaCl
2 g/l Rinderserumalbumin

E: 0,05 mol/l KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, pH 7,5
0,1 mol/l NaCl
10 g/l Rinderserumalbumin

F: 0,01 mol/l KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, pH 7,5

0,15 mol/l NaCl

1 g/l Rinderserumalbumin

G: 0,01 mol/l KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, pH 7,5

0,15 mol/l NaCl

1 g/l Rinderserumalbumin

0,01 mol/l EDTA

H: Puffer B und 0,2 mol/l Methyl-alpha-D-Glucopyranosid

I: Puffer B und 1,0 mol/l Methyl-alpha-D-Glucopyranosid

K: 0,01 mol/l Glycin, pH 3

Alle Puffer enthielten 0,2 g/l Natriumazid

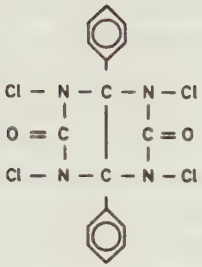
3. METHODEN

3.1. Radioaktive Markierung von hCG-α mit NaI-125

Die radioaktive Markierung von hCG-α erfolgte sowohl nach der Iodo-Gen™- Methode als auch nach einer Modifikation der von Greenwood und Hunter 1963 beschriebenen Chloramin-T-Methode (13,23,38).

3.1.1. Prinzip

Chloramin-T oxidiert im schwach alkalischen Bereich (ph 7,5) Natriumjodid zum Jod-Kation, das seinerseits mit den Tyrosylresten des Proteins reagiert und dort angelagert wird. Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von $Na_2S_2O_5$ und zusätzliche Verdünnung. Markiertes Hormon und Jodsalz werden durch Gelchromatographie voneinander getrennt.
Iodo-Gen ™ (1,3,4,6-Tetrachloro-3α , 6α -diphenylglycoluryl) ist eine wasserunlösliche stabile Verbindung, die als Festsubstanz mit einer wässrigen Lösung von Jodid und Protein reagiert und jodierte Proteine nach demselben Schema, d.h. Einführen von Jod-Kationen in Tyrosylreste von Proteinen, herstellt.
Diese Methode wird von Ferguson und Jeffcoate wegen ihrer schonenden Art für die Markierung von LH empfohlen (18).



IODO - GEN ™

Abb. 1: Strukturformel von 1,3,4,6-Tetrachloro-3α , 6α -diphenylglycoluryl (Iodo-Gen™)

3.1.2. Markierungsreaktion

Bei der Chloramin-T-Markierung wurden 2,5 ug hCG-α (in Puffer B) mit 0,4 mCi NaI-125 Lösung (in A) und 10 ul Puffer A versetzt und nach vorsichtigem Schütteln die Gesamtaktivität gemessen. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 30 ug Chloramin-T (in B). Es wurde 20 Sekunden bei Raumtemperatur auf einem Eppendorfmixer gemischt. Zugabe von 50 ug $Na_2S_2O_5$, gelöst in Puffer B, und 200 ul Puffer D stoppten die Reaktion.
Für die Iodo-Gen™-Markierung wurden 2,5 ug hCG-α (in Puffer B) in ein mit Iodo-Gen™ beschichtetes Röhrchen übergeführt. Nach Verdünnen mit 20 ul Puffer K wurden 0,5 mCi NaI-125 (in B) zugegeben und 15 Sekunden vorsichtig auf einem Vibrationsmixer geschüttelt, danach die Gesamtaktivität gemessen. Die Markierungszeit betrug maximal 25-30 Sekunden.

3.1.3. Trennung des markierten hCG-α vom ungebundenen Jodid

Zur weiteren Abtrennung von ungebundenem NaI-125 wurde bei der Chloramin-T-Methode das Reaktionsgemisch einer Gelchromatographie auf einer Biogel-P-6-Säule unterzogen. Markierungsprodukt und 50 ul einer Kaliumjodidspüllösung wurden auf die Säule aufgetragen. Es wurde mit Puffer C unter einem Druck von 15 cm Wassersäule eluiert. Ein automatischer Fraktionssammler teilte das Eluat in Eppendorfgefäße, in denen 200 ul Puffer D vorgelegt waren, in Portionen zu 1 ml auf. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde sofort mit einem Szintillationszähler bestimmt (Impulse/30 Sekunden). Die Auftrennung nach der Iodo-Gen™-Markierung erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie über eine Sephadex SP-C-25-Säule. 500 - 1000 ul Puffer K dienten zum Ausspülen des Iodo-Gen™-Röhrchens und wurden ebenso wie das Markierungsprodukt auf die Säule aufgetragen. Es wurde in Portionen zu 500 ul fraktioniert. Als Elutionsmittel für NaI-125 diente Puffer K, für markiertes hCG-α Puffer B. Auch hier wurde die Radioaktivität sofort bestimmt.

Schema 1: Pipettierschema für die Markierung von hCG-α nach der Chloramin-T-Methode

1. 30 ul NaI-125-Lösung entsprechend 0,4 mCi
   (1 mCi NaI-125 lösen in 70 ul Puffer A)
2. 10 ul Puffer A
3. 2,5 ug hCG-α , gelöst in 10 ul Puffer B

1., 2. und 3. werden in ein Reaktionsgefäß gegeben

dazu 10 ul Chloramin-T-Lösung entsprechend 30 ug (Start)
(3 mg Chloramin-T in 1 ml Puffer B)

Schütteln in einem Eppendorf Taumelmixer 15-20 Sekunden

Stoppen der Reaktion mit 20 ul $Na_2S_2O_5$-Lösung entsprechend 50 ug

($2{,}5$ mg $Na_2S_2O_5$ in 1 ml Puffer B)

dazu 200 ul Puffer D

mischen, Zählrate feststellen

Reaktionsgemisch auf Biogel-P-6-Säule

Ausspülen des Reaktionsgefäßes mit 50 ul KJ entsprechend 500 ug (5 mg KJ in 500 ul aqua bidest)

Spülflüssigkeit auf Biogel-P-6

Schema 2: Pipettierschema für die Markierung von hCG-α nach der Iodo-Gen™-Methode

---

1. 2,5 ug hCG-α , gelöst in 10 ul Puffer B
2. 20 ul Puffer K
3. Iodo-Gen™- Röhrchen
   (5 ug Iodo-Gen™ mit 50 ul Chloroform in einem Eppendorf-gefäß lösen und das Chloroform bei Raumtemperatur unter dem Abzug eine Stunde abdampfen. Niederschlag an der Wand).

1. und 2. in 3.

dazu 0,5 mCi NaI-125, gelöst in 20 ul Puffer B

schütteln in einem Eppendorf Taumelmixer, Gesamtdauer 25-30 Sekunden

Messung der Gesamtaktivität

Reaktionsgemisch auf Sephadex-SP-C-25-Säule

Ausspülen des Reaktionsgefäßes mit 500 - 1000 ul Puffer K

Spülflüssigkeit auf Sephadex SP-C-25

3.1.4. Rechromatographie des markierten hCG-α

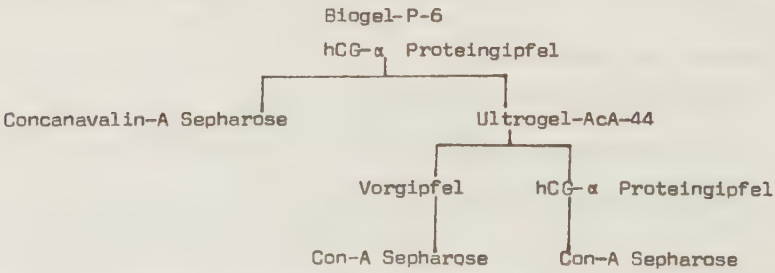
Bei beiden Markierungsarten wurde die Spitzenfraktion des

hCG- α -Gipfels in gleicher Weise durch Gelchromatographie über Biogel-P-60 weiter gereinigt. Zu diesem Zweck wurde die Gipfelfraktion und das Spülvolumen des Eppendorfgefäßes (mit Puffer C) auf die Säule aufgetragen und mit Puffer C unter einem Druck von 22 cm Wassersäule eluiert. Auch hier wurde die Radioaktivität der Fraktionen (1 ml) sofort wieder bestimmt. Nach Durchführung unserer Versuche zur Reinigung des Tracers rechromatographierten wir alle nachfolgend erhaltenen Markierungsprodukte auf einer Concanavalin-A-Säule. Die Fraktionen wurden im Bereich des aufsteigenden-(I), absteigenden (III) Schenkels und der Gipfelfraktion (II) vereinigt. Alle drei Portionen wurden mit Puffer G so verdünnt, daß 100 ul im Gammazählgerät eine Aktivität von 20000 Impulse/1 Minute ergaben. Bis zum weiteren Gebrauch lagerten wir den Tracer in Fraktionen zu 9 ml bei $-40^{\circ}C$.

3.1.5. Versuche zur Tracerreinigung

Wir nahmen eine Chloramin-T-Markierung zum Anlaß, zum Zwecke einer vollständigeren Tracerreinigung weitere Untersuchungen anzuschließen. Dazu wurde das durch Biogel-P-6-Chromatographie gereinigte ^{125}I-hCG-α nach folgendem Schema weiteren Säulenläufen unterzogen:

Schema 3: Reinigung von ^{125}I-hCG-α durch Säulenchromatographie



Die Chromatographie auf einer Concanavalin-A-Sepharose Säule geht auf einen Vorschlag von Dufau et al. (12) zurück. Es ist ein Metalloprotein, das in Anwesenheit von Mg- und Ca - Ionen spezifisch Zucker, Polysaccharide und Glykoproteine bindet (40). Nach dem Auftragen des markierten Hormons auf die Säule wurden restliches NaI-125 und nichtbindende Anteile des hCG-α mit Puffer B in 10 Eppendorf-Gefäße zu je 1 ml eluiert, in die jeweils 100 ul Puffer E vorgelegt waren. Wir eluierten die nachfolgenden Fraktionen 11-30 mit Puffer H. Das darin enthaltene Methyl- α - D - Glucopyranosid verdrängte das Glykoproteinhormon hCG-α aus seiner Bindung an Concanavalin-A-Sepharose. 10 ml des höhermolaren Puffer I gewährleisteten die vollständige Ablösung des Proteins.
Bei der Chromatographie an einer Ultrogel-AcA-44 Säule wurde mit Puffer C gespült, wobei die Fließgeschwindigkeit durch eine Pumpe konstant gehalten wurde. Auch hier wurden Fraktionen zu 1 ml gesammelt.
Die unterschiedlich gereinigten Tracerfraktionen wurden im hCG-, hCG-α und hCG-β-RIA auf ihre Bindungsfähigkeit an verschiedenen Antikörpern geprüft. Die jeweiligen Antikörper I gelangten in Arbeitskonzentration und im Überschuß zur Anwendung. Zum Vergleich chromatographierten wir unmarkierte hCG-α Reinsubstanz sowohl über Concanavalin-A-Sepharose als auch über Ultrogel-AcA-44.

3.1.6. Stabilität des hCG-α Tracers

Die Stabilität des Chloramin-T- und des Iodo-Gen^{TM}-markierten Tracers wurde mit zwei verschiedenen Methoden geprüft:

- durch wöchentliche Bestimmung der mittleren spezifischen Bindung an Anti-hCG-α , d.h. der Fähigkeit des Tracers sich an den ersten Antikörper zu binden,
- durch wöchentliche Bestimmung des freien NaI-Anteils nach Chromatographie des Chloramin-T-markierten Tracers an einer Ultrogel-AcA-44 Säule.

Schema 4: Vorbereitung der Chromatographiesäulen

Biogel-P-6:

Säule 1x13 cm

7 g Gel in Puffer B einweichen

mit der Wasserstrahlpumpe entlüften

gießen

1 ml Puffer D

nachwaschen mit Puffer C

eluieren mit Puffer C unter einem Druck von 15 cm Wassersäule

Biogel-P-60:

Säule 1.5x59 cm

15 g Gel in Puffer C einweichen (12 Stunden bei 22°C)

mit der Wasserstrahlpumpe entlüften

gießen

nachwaschen mit Puffer E

eluieren mit Puffer C unter einem Druck von 22 cm Wassersäule

Sephadex SP-C-25:

Säule Plastikspritze (1 ml Gelvolumen)

wenig Gel in Puffer K einweichen (12 Stunden bei 0°C)

1 ml Gel in Säule gießen

eluieren von NaI-125 mit Puffer K, von hCG-α mit Puffer B

Concanavalin-A-Sepharose:

Säule silikonisierte Pasteurpipette (2x0,6), deren Auslaß

mit Glaswolle locker verstopft ist

1 ml Gel in Säule gießen

äquilibrieren mit 10 ml Puffer B

NaI-125 eluieren mit 10 ml Puffer B

^{125}I-hCG-α eluieren mit 20 ml Puffer H und 10 ml Puffer I

Ultrogel-AcA-44:

Säule 1.5x90 cm

Gel in Säule gießen

nachwaschen mit Puffer C

eluieren mit Puffer C bei 4°C und einer Flußgeschwindigkeit

von 10 ml/Stunde (Schlauchpumpe LKB Varioperexpumpe)

3.2. Antiseren

Neben einem eigenen durch Immunisierung eines Kaninchens gewonnenen Antiserum, standen uns vier weitere gegen die α-Untereinheit der Glykoproteinhormone gerichtete Antiseren zur Verfügung.

3.2.1. Immunisierung

Die Immunisierung 3 kg schwerer Wildkaninchen wurde nach der Methode von Pecorelli (46) durchgeführt. Zu diesem Zweck vermischten wir 0,9 ml steriles Mineralöl mit 0,1 ml inkomplettem Freund'schen Adjuvans. 0,7 ml dieser Mischung wurden mit 0,3 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung, der 50 ug der Reinpräparation von hCG-α CR 117 zugefügt waren, über einen Drei-Wege-Hahn in zwei 2 ml Spritzen durch 100 maliges Hin- und Herziehen miteinander vermengt. Anschließend injizierten wir diese rahmige Suspension den Kaninchen subcutan, streng auf eine Stelle begrenzt am Rücken.
Zur Bestimmung des Antikörper-Titers entnahmen wir am 29., 62., 85., 91. und 105. Tag nach der Immunisierung Blut aus der Ohrrandvene. Wir ließen es 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen, zentrifugierten 10 Minuten bei 6000 U/min., pipettierten das Serum ab und bestimmten den Titer.
Nach 115 Tagen gewannen wir das Blut quantitativ. Nach i.v. Narkose präparierten wir die A. carotis communis frei, entbluteten über einen Kunststoffkatheder und punktierten noch direkt die Herzhöhlen.
Das Blut wurde zur maximalen Blutgerinnung zwei Stunden bei 37°C und zur besseren Retraktion des Blutgerinnsels zwölf Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 6000 U/min. und Raumtemperatur wurde das Serum dekantiert und der Rest nach nochmaligem Zentrifugieren abpipettiert. Um eine bakterielle Kontamination zu verhindern, wurden 0,1 % Natriumazid zugefügt (17,49).

3.2.2. Lagerung der Antiseren

Das Serum des immunisierten Kaninchens "Irmi" wurde unverdünnt, die Antiseren A und C mit Puffer F 1:1000 vorverdünnt in 1 ml Portionen und Antikörper D (1:100) in 0,5 ml Portionen bei - 60°C tiefgefroren. Wir versuchten, mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren möglichst zu vermeiden.

3.2.3. Titerbestimmung

Durch Bestimmung der spezifischen Bindung von Antikörperverdünnungsreihen von 1:250 - 1:128 000 mit einer konstanten Konzentration von markiertem Antigen wurden die Entwicklung des Antikörpertiters im Serum der immunisierten Kaninchen und die Titer der weiteren Antikörper festgestellt.

3.3. Präzipitierendes Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antiserum (40)

Zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Antigen wurde als präzipitierendes Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antiserum ein Ziegenserum mit einem Titer von 1:64 (Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony) des Labors Dr. Mann verwendet.

3.4. Reaktionsbedingungen

Die Empfindlichkeit oder Sensitivität eines Radioimmunoassays ist definiert als die geringste Menge von unmarkiertem Hormon, die mit Hilfe dieser Bestimmungsmethode noch nachweisbar ist (43). Um diese Empfindlichkeit zu erhöhen, wurden in einzelnen Versuchen durch Veränderung jeweils nur eines Parameters optimale Reaktionsbedingungen ermittelt.

3.5. Durchführung der Radioimmunoassays

Neben dem eigenen, gegen die α-Untereinheit des hCG gerichteten Radioimmunoassay, kamen weitere RIA's zur Anwendung (hCG, hCG-β und LH).

3.5.1. hCG-α Radioimmunoassay

Nach allen Optimierungs- und Spezifitätsuntersuchungen ergab sich für die hCG-α Bestimmung folgendes Schema:
300 ul Puffer F, 100 ul Antiserum (unter Routinebedingungen "Irmi" mit Puffer F in der Verdünnung von 1:3000), 100 ul Tracer (0,09 ng/l, mit Kaninchenserum 300%) und 100 ul Standardlösung oder unbekannte Probe wurden in Polystyrolröhrchen nach gründlichem Mischen 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Zufügen von 100 ul Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antiserum (Ziege, mit Puffer F 1:40) und nochmaligem Mischen wurde eine weitere Inkubation von 4 Stunden bei 4°C durchgeführt. Anschließend zentrifugierten wir alle Proben bei 3000 U/min und 4°C 20 Minuten lang, dekantierten den Überstand und trockneten mit Saugpapier, damit nur die Aktivität des Doppelantikörperkomplexes im Bodensatz erfaßt wurde. Die Proben wurden sofort im Gamma Counter (Autogamma Berthold) zwei Minuten lang gezählt. Alle T- und B_o-Werte wurden sechsfach, alle Meß- und N-Werte dreifach angesetzt. Die Verdünnungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Puffer F durchgeführt, ein Gesamtvolumen von 700 ul wurde immer eingehalten.

Schema 5: Radioimmunologische Bestimmung von hCG-α , Pipettier- und Inkubationsschema (in Mikroliter)

	T Total	N unspez. Bdg.	B_o Leerwert	B Standard/ Probe
Puffer F	-	500	400	300
Standard/Probe	-	-	-	100
^{125}I-hCG-α 1:300 Kaninchenserum	100	100	100	100
Antiserum, z.B. "Irmi"	-	-	100	100
	Inkubation bei 4°C, 48 h			
Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antis. 1:40 in Puffer F	-	100	100	100
	Inkubation bei 4°C, 4 h			
	Zentrifugation 3000 g, bei 4°C, 20 min. dekantieren, trocken wischen im Gamma-Zählgerät 2 Minuten zählen			

3.5.2. hCG- und LH- Radioimmunoassay

Die Bestimmung von Lutropin erfolgte mit Hilfe eines LH/hCG-RIA, in den beide Hormone eingehen (26,40).
Zur Gewinnung eines Antiserums waren Wildkaninchen bei der Grundimmunisierung je 5000 I.E. Primogonyl ^{R}(hCG-Präperat der Fa. Schering) in komplettem Freund'schen Adjuvans subcutan injiziert worden. Später erfolgte noch eine dreimalige Boosterung mit jeweils 2500 I.E. in inkomplettem Freund'schen Adjuvans. Das erhaltene Antiserum wurde in einer Konzentration

von 1:40000 eingesetzt. Als Standardverdünnungskurve diente das Präparat LH 68/40 der WHO. Als Antiserum zur spezifischen Bestimmung von hCG wurde Anti-hCG-ß Serono in einer Endverdünnung von 1:20000 eingesetzt, 2nd I.R.P-hCG (WHO)diente als Standard. In beiden Fällen wurden 100 ul Antiserum, 100 ul Puffer E und 100 ul Standard oder Probe nach einer "kalten Vorinkubation" von 48 Stunden bei 22°C mit 100 ul ^{125}I-hCG-Tracer (CR 115, 1:300)versetzt und eine weitere Inkubation von 24 Stunden bei 22°C eingehalten. Die weitere Behandlung erfolgte wie im hCG-α Assay.

3.5.3. hCG-ß Radioimmunoassay

Im hCG-ß Radioimmunoassay kamen ^{125}I-hCG-ß (CR 115ß, 1:300) als Tracer, Anti-hCG-ß (AS 16, 1:3000) als Antiserum, hCG-ß (CR 115ß) als Standard und Puffer E zur Anwendung. Die eingesetzten Mengen betrugen 100 ul. Die weitere Behandlung erfolgte wie im LH- und hCG-RIA. Auf eine Vorinkubation wurde verzichtet. (39,40)

3.6. Auswertung der Radioimmunoassays

Zur Auswertung der Radioimmunoassays wurden folgende Daten herangezogen: T, N, B_o und B.
Der T-Wert bezeichnete die Aktivität von 100 ul Tracerlösung.
Die N-Werte wurden aus dem Niederschlag von Proben ermittelt, die nur Puffer, Tracer und Doppelantikörper enthielten.
Der B_o-Wert stellt die Aktivitätsmenge dar, die sich ergibt, wenn als Antigen nur Tracer eingesetzt wurde.
Die B-Werte berechneten sich aus Proben, die zusätzlich entweder Standardlösung in einer bekannten oder hCG-α in einer unbekannten Konzentration enthielten.
Aus diesen Werten, die als Impulse pro zwei Minuten erhalten wurden, ließen sich folgende Daten ermitteln:

Spezifische Bindung in % von T: $\frac{B - N}{T - N} \times 100$

Unspezifische Bindung in % von T: $\frac{N}{T} \times 100$

Zur Ermittlung der Standardkurven wurde für jede hCG-α Verdünnungsstufe der Wert $\frac{B - N}{B_o - N} \times 100$ (in %) bestimmt.

Die so erhaltenen Daten (Ordinate) wurden gegen die Konzentration (ug/l, Abszisse) in einem Diagramm aufgetragen (16). Die graphische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven erfolgte nach Rodbard (54) entweder in linear-logarithmischer oder in logit-logarithmischer Transformation. Dabei ergab sich im ersten Fall ein sigmoider Kurvenverlauf, im zweiten Fall eine Gerade, wobei hier durch Steigungsvergleich ein unterschiedlicher Verlauf der Bindungskurven besonders gut beurteilbar war.

Der Titer errechnet sich aus $\frac{B - N}{T} \times 100$ (% Bindungsfähigkeit)

Die Berechnung der Kreuzreaktion erfolgte nach zeichnerischer Transformation der Meßwerte auf logit-log-Papier. Es wurde so auf Parallelität geprüft und die Kreuzreaktion ermittelt nach:

$\frac{A_{50}}{B_{50}}$ = Kreuzreaktion (in %)

wobei A_{50} = Menge an unmarkiertem Antigen, die 50 % des Tracers aus der Bindung an den Antikörper verdrängt.

B_{50} = Menge an kreuzreagierender Substanz B, die 50 % des Tracers aus der Antikörperbindung verdrängt.

(20, 40, 49).

Die Variationskoeffizienten wurden nach folgenden Formeln berechnet:

Interassay-Vk = $\frac{\text{gemittelte S aller Werte}}{\text{gesamt } \bar{x}} \times 100$ (%)

Intra-assay-Vk = $\sqrt{\frac{S_1^2 + \ldots\ldots\ldots + S_n^2}{\text{Zahl der Assays Vielfachheit}}} \times 100$ (%)

wobei S = Standardabweichung = $\sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$

und $\bar{x}$ = Mittelwert

(13, 40, 58)

Zusätzlich führten wir, besonders zur Ermittlung von Standardkurven und bei größeren Probeläufen, eine rechengesteuerte Auswertung am Rechner Siemens 4004 des Fachbereichs der Universität mit der Spline-Approximationsmethode durch (27).

3.7. Kreuzreaktion

Die Anwesenheit von Kreuzreaktionen der verschiedenen gegen die α - Kette gerichteten Antiseren wurde mit zahlreichen Hormonpräparationen überprüft.

3.7.1. Methodik

Zur Austestung gelangten folgende Hormonpräparationen: hCG-α (CR 117), TSH-α (Calbiochem), LH-α (Calbiochem), hCG (CR 115), TSH (RP 1), TSH (Calbiochem), TSH (Paesel), LH-β (Cal.), LH (LER 960), LH (Biodata), LH (Calbiochem), LH (68/40), FSH (HS-1), hCG-β (CR 115B). Die Antikörper wurden in den früher ermittelten Arbeitskonzentrationen eingesetzt. Die zu untersuchenden Hormonpräparationen wurden in Puffer F gelöst und in einer Verdünnung von 0,08-80 ug/l ebenso wie eine Standard-hCG-α Verdünnungsreihe als unmarkiertes Antigen im RIA verwendet. Alle Kreuzreaktionen wurden in Dreifachwerten in jeweils drei bis vier verschiedenen Ansätzen ermittelt.
Die Kreuzreaktion bestimmt sich aus der Menge an Hormon, die 50 % markiertes hCG-α von seiner Bindungsstelle am Antikörper verdrängen kann (61).

3.7.2. Vergleich der Steigung der Verdünnungskurven

Die Verdünnungskurven der kreuzreagierenden Hormone wurden zusammen mit der Standardverdünnungskurve des hCG-α in logit-log Transformation aufgetragen (61).

3.7.3. Chromatographische Reinigung verschiedener Hormonpräparationen

Um das Ausmaß der Verunreinigung von LH (LER 960) und hCG (CR 115) mit der freien α - Untereinheit zu prüfen, wurden diese Hormonpräparationen einer Reinigung auf einer Ultrogel-AcA-44 Säule (1,5 x 90 cm) unterzogen. Zu diesem Zweck trugen wir 1,5 ug/ml LH beziehungsweise 1,25 ug/ml hCG auf die Säule auf und ermittelten den Hormongehalt der eluierten Fraktionen im LH- und hCG-α - sowie im hCG- und hCG-α -RIA. Zusätzlich chromatographierten wir iodiertes hCG und hCG-α . Die Kreuzreaktionen jeweils zweier Fraktionen im Bereich des LH- und des hCG-α - Gipfels mit LH wurden berechnet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Radioaktive Markierung und Reinigung von hCG-α

4.1.1. Spezifische Aktivität

Die spezifische Aktivität lag bei Anwendung der Chloramin-T-Methode durchschnittlich bei 147 uCi/ug (90-200 uCi/ug, N=7). Eine Verlängerung der Markierungszeit von 15 auf 30 Sekunden hatte keinen Einfluß auf die erzielte spezifische Aktivität. Mit der Iodo-Gen™ Methode wurden Werte von 162 uCi/ug (135-185 uCi/ug, N=3) erreicht (Berechnung nach 26).

4.1.2. Chromatographie des Markierungsproduktes

Die Trennung des markierten Proteins vom ungebundenen NaI-125 erfolgte bei der Chloramin-T-Methode durch Gelchromatographie über Biogel-P-6, wobei hier, im Gegensatz zur Ionenaustausch-chromatographie an Sephadex SP-C-25, zuerst markiertes hCG-α dann Jodsalz im Eluat erschien. (Abb. 2)
Die Rechromatographie der Spitzenfraktion des Hormongipfels wurde bei beiden Markierungsarten an einer Biogel-P-60 Säule, später an einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule durchgeführt. Für beide Markierungsmethoden ergab sich im Biogel-P-60 Elutionsprofil ein dreigipfeliger Verlauf, Concanavalin-A-Sepharose wies zwei Gipfel auf (Abb. 3 und Abb. 4). Wir verdünnten die Fraktionen des auf- beziehungsweise des absteigenden Teils und des Gipfels des höchsten und am spätesten eluierten Peaks und benutzten sie in der Folgezeit als Tracer.

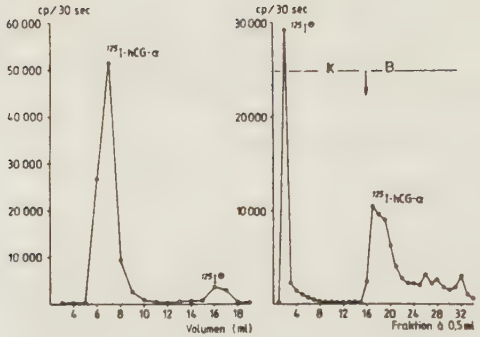


Abb. 2: Gelchromatographie von ^{125}I-hCG-α an Biogel-P-6 (Säule 1 x 13 cm) in Puffer C (links). Ionenaustauschchromatographie von ^{125}I-hCG-α an Sephadex SP-C-25 (Säule 2 ml Plastikspritze); Elution von ^{125}I mit Puffer K, von ^{125}I-hCG-α mit Puffer B

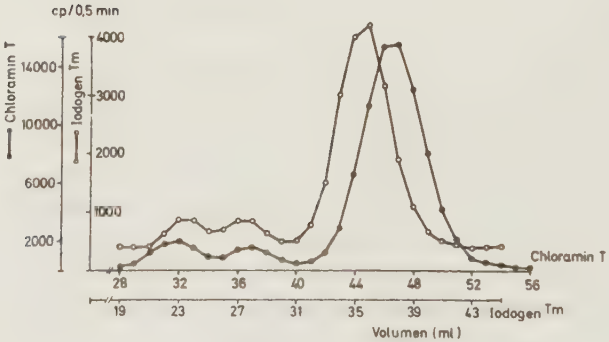


Abb. 3: Gelchromatographie von ^{125}I-hCG-α an Biogel-P-60 (Säule 1,5 x 59 cm); Markierung nach der Chloramin-T-Methode (●—●) und nach der Iodo-Gen™-Methode (○—○).

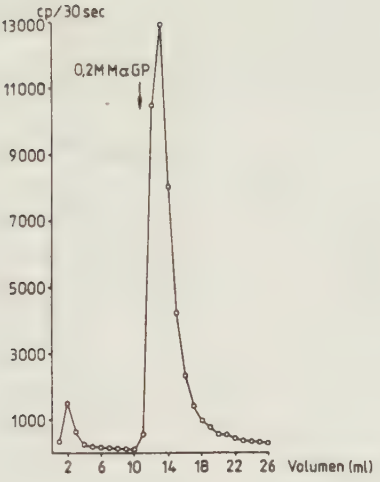


Abb. 4: Affinitätschromatographie von ^{125}I-hCG-α an Concanavalin-A-Sepharose (1ml Säulenvolumen)

4.1.3. Tracerreinigung

Die Elutionsdiagramme der Gel- und Affinitätschromatographien, die nach dem unter 3.1.5. erwähnten Schema zur Tracerreinigung durchgeführt wurden, sind der Abb. 5 zu entnehmen. Tab. 3 stellt den Einfluß der Reinigung des ^{125}I-hCG-α auf die spezifische Bindung an die Antiseren Anti-hCG-α "Irmi", Anti-hCG-β Union Carbid und Anti-hCG-β Serono dar.

Abb. 5: Elutionsdiagramme von ^{125}I-hCG-α (CR 117α) und prozentuale Wiederfindung nach Chromatographie an Biogel-P-6, Concanavalin-A-Sepharose und Ultrogel-AcA-44.

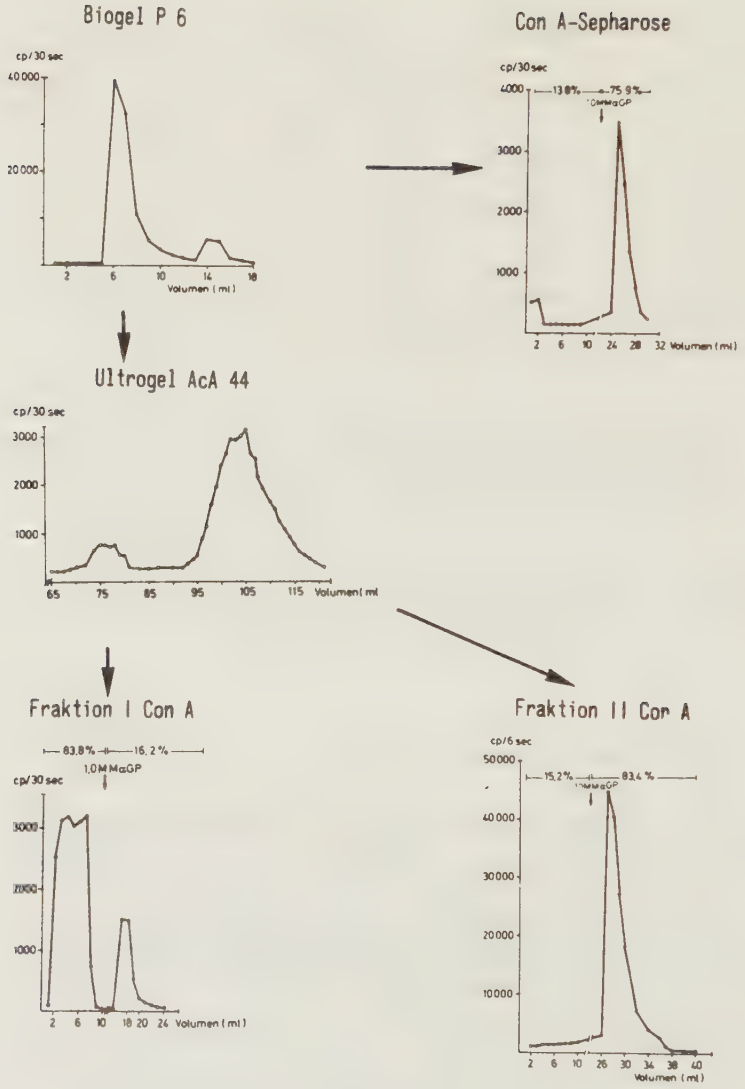

Biogel P 6
cp/30 sec
40 000
20 000
2
6
10
14
18
Volumen (ml)
Con A-Sepharose
cp/30 sec
4000
3000
2000
1000
13,8%
75,9%
1,0 MαGP
2
6
10
24
28
32 Volumen (ml)
Ultrogel AcA 44
cp/30 sec
3000
2000
1000
65
75
85
95
105
115 Volumen (ml
Fraktion I Con A
83,8%
16,2%
1,0 MαGP
cp/30 sec
3000
2000
1000
2
6
10
18
20
24 Volumen (ml)
Fraktion II Con A
cp/6 sec
50 000
40 000
30 000
20 000
10 000
15,2%
83,4 %
1,0 MαGP
2
6
10
26
30
34
38
40
Volumen (ml)

Abb. 5:

Tab. 3:

Frakt. d. Chromat.	Antiserum	Bindung B_o= B - T/T x 100 (%) Verdünnung 1:640	1:3000	1:1	1:6	1:10	1:25
Biogel -P-6							
	[1]Anti-α I	58,9	33,6				
	[2]Anti-β S			4,3	1,3		
	[3]Anti-β U					0,3	0,1
Biogel -P-6 und Con-A-Sepharose							
nicht geb.	Anti-α I	1,6	1,2				
	Anti-β S			0,5	0,3		
	Anti-β U					0,2	0,2
gebunden	Anti-α I	71,9	36,8				
	Anti-β S			3,2	0,5		
	Anti-β U					0,2	0,2
Biogel -P-6 und Ultrogel-AcA-44							
Fraktion 1	Anti-α I	11,2	6,4				
	Anti-β S			1,1	0,3		
	Anti-β U					0,3	0,2
Fraktion 2	Anti-α I	65,4	35,8				
	Anti-β S			3,3	0,6		
	Anti-β U					0,1	0,1
Biogel -P-6, Ultrogel-AcA-44, Fraktion 1 und Con-A-Sepharose							
nicht geb.	Anti-α I	0	0				
	Anti-β S			0	0		
	Anti-β U					0	
gebunden	Anti-α I	58,6	38,3				
	Anti-β S			5,8	1,2		
	Anti-β U					0,5	
Biogel -P-6, Ultrogel-AcA-44, Fraktion 2 und Con-A-Sepharose							
nicht geb.	Anti-α I	10,8	7,4				
	Anti-β S			0,8	0,4		
	Anti-β U					0	
gebunden	Anti-α I	74,6	49,5				
	Anti-β S			4,2	2,2		
	Anti-β U					0,2	

[1]Anti-hCG-α "Irmi", [2]Anti-hCG-β Serono, [3]Anti-hCG-β Union Carbid

Tab. 3: Vergleich der spezifischen Bindung von ^{125}I-hCG-α (CR 117α) an Anti-hCG-α "Irmi", Anti-hCG-β Serono und Anti-hCG-β Union Carbid nach Chromatographie des Tracers an Biogel-P-6; P-6 und Ultrogel-AcA-44; P-6 und Con A-Sepharose; P6, AcA-44 und Con A-Sepharose.

Die starke Erhöhung der spezifischen Bindung an das Antiserum "Irmi" des auf Biogel-P-6 entsalzten und durch Chromatographie an Con A-Sepharose weiter gereinigten ^{125}I-hCG-α (58,9%/33,6% - 71,9%/36,8%) zeigte den Nutzen der Nachreinigung. Die Abtrennung lediglich hochmolekularer Verbindungen mittels Gelchromatographie an Ultrogel-AcA-44 erbrachte im Vergleich hierzu nur eine geringe Steigerung der Bindungsraten (65,4%/35,8%). Die weitere Reinigung des hier eluierten Hormongipfels durch Affinitätschromatographie erzielte aber dann optimale Werte 74,6%/49,5%). Nachdem aber ^{125}I-hCG-α nach Con A-Chromatographie, bei Verzicht auf Reinigung über Ultrogel-AcA-44, an das Antiserum "Irmi" nur vernachlässigbar geringer band und der Zeitgewinn auf diese Weise ganz erheblich war, wurde bei allen weiteren Chloramin-T Markierungen die Reinigung des Markierungsproduktes über Biogel-P-6 und nachfolgend über Concanavalin-A-Sepharose durchgeführt.

Zur näheren Charakterisierung der sich bei der Chromatographie über AcA-44 und Con A darstellenden Vorgipfel wurden weitere Versuche durchgeführt. Durch fehlende Bindung an Anti-hCG-β (Union Carbid) konnten Verunreinigungen mit hCG-β als Ursache der Vorgipfel ausgeschlossen werden. Die Kontamination der hCG-α Präparation mit geringen Mengen an hCG, das durch keinen Reinigungsschritt abgetrennt werden konnte, zeigt sich in den im hCG-Assay ermittelten spezifischen Bindungen. Die Chromatographie von unmarkierter hCG-α (CR 117α) Reinsubstanz sowohl über AcA-44 als auch über Con A erbrachte jeweils einen einzigen homogenen Gipfel (Abb. 6). Damit mußte das Auftreten der Vorgipfel als Markierungsfolge gedeutet werden. Der Einfluß von freiem NaI-125 war, nachdem die Affinitätschromatographie kurz nach der Markierung und P-6 Filtration des Tracers durch-

geführt wurde, zu vernachlässigen. 83.8% des durch Chromatographie über Con A gereinigten Vorgipfels erwies sich als weder an Con A noch an den Antikörper bindend. Der relativ starke Anstieg der spezifischen Bindung nach Con A Chromatographie zeigte, daß sich wahrscheinlich in erster Linie Substanzen mit verändertem Kohlehydratanteil als störend erwiesen. Daneben lagen aber auch hochmolekulare Verbindungen (AcA-44), möglicherweise durch die Markierung entstandene Aggregate vor.

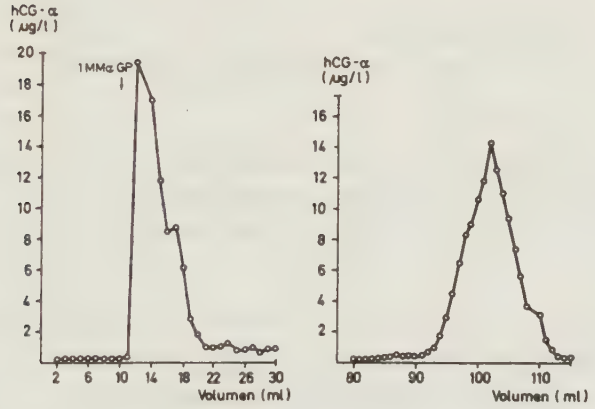


Abb. 6: Affinitätschromatographie von hCG-α (CR 117α) an einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule (1 ml Säulenvolumen, links) und Gelchromatographie an einer Ultrogel-AcA-44 Säule (1,5 x 90 cm, rechts).

4.1.4. Stabilität des markierten hCG-α

In den ersten 4 - 5 Wochen wiesen die Fraktionen II und III der Biogel-P-60-Säule des nach der Chloramin-T-Methode markierten ^{125}I-hCG-α im Vergleich zur Fraktion I eine höhere spezifische Bindung an das Antiserum auf. Deshalb wurden diese

beiden Fraktionen als Tracer verwandt. Nachdem der Zeitraum, in dem Tracer einer Markierung eingesetzt wurde, etwa 5 Wochen betrug, fiel die größere Stabilität von I gegenüber strahlenchemischen Einflüssen, die sich im Vergleich zu II und III in besonderem Maße erst nach einem Monat auswirkte, nicht mehr ins Gewicht. Die Bindungskapazität nahm nach 7 - 8 Wochen für Fraktion I um 35 % ab, für die Fraktionen II und III dagegen um 62%. (Abb. 7)

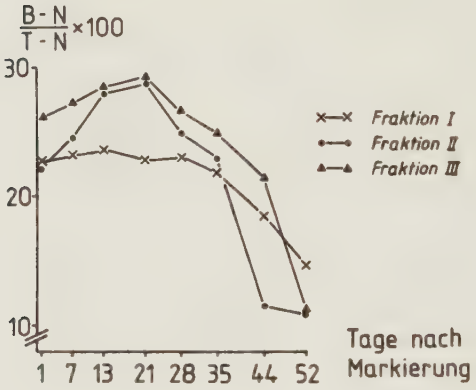


Abb. 7: Abnahme der mittleren spezifischen Bindung (in Prozent) des nach der Chloramin-T-Methode markierten ^{125}I-hCG-α an das Antiserum Anti-hCG-α "Irmi" im Zeitverlauf.

Die drei Fraktionen des nach der Iodo-Gen™-Methode markierten ^{125}I-hCG-α verhielten sich dagegen sowohl in ihrem anfänglichen Bindungsvermögen an das Antiserum "Irmi" als auch in ihrer Stabilität annähernd identisch. Der prozentuale Bindungsverlust aller drei Fraktionen der Biogel-P-60-Säule betrug innerhalb von 43 Tagen etwa 41% (Abb. 8).

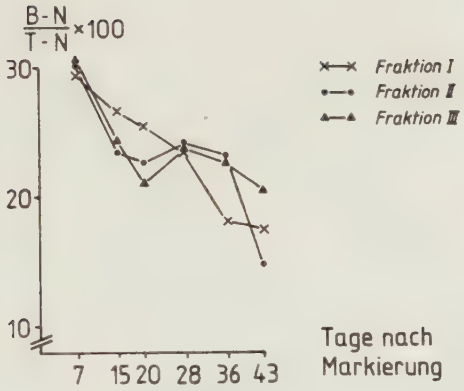


Abb. 8: Abnahme der mittleren spezifischen Bindung (in Prozent) des nach der Iodo-Gen™-Methode markierten ^{125}I-hCG-α an das Antiserum Anti-hCG-α "Irmi" im Zeitverlauf.

Die Bestimmung der Abspaltung von freiem NaJ-125 vom markierten ^{125}I-hCG-α durch Gelchromatographie des Tracers über einer Ultrogel-AcA-44 Säule ist in Abb. 9 dargestellt. Freies ^{125}Jod nahm innerhalb von 30 Tagen um 14% zu.

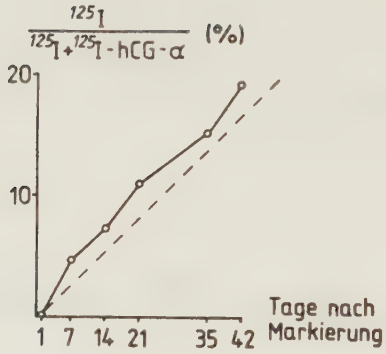


Abb. 9: Prozentuale Abspaltung von NaJ-125 vom ^{125}I-hCG-α in Abhängigkeit von der Zeit. Bestimmung durch Chromatographie des Tracers auf Ultrogel-AcA-44.

4.2. Antiseren

4.2.1. Titerbestimmung

Die Titer der Antiseren sind definiert als 100 ul derjenigen Verdünnung der Antiseren in einem Assay, die der halbmaximalen Bindung an 0,1 ng ^{125}I-hCG-α entspricht. Dadurch ist noch eine Konkurrenzreaktion zwischen markiertem und unmarkiertem Hormon um die Bindungsstellen am Antikörper möglich (17,28,40,49).

Die Abb. 10 zeigt die spezifische Bindung von ^{125}I-hCG-α an das zu verschiedenen Zeiten nach der Immunisierung des Kaninchens "Irmi" entnommene und in zunehmender Verdünnung eingesetzte Antiserum Anti-hCG-α .

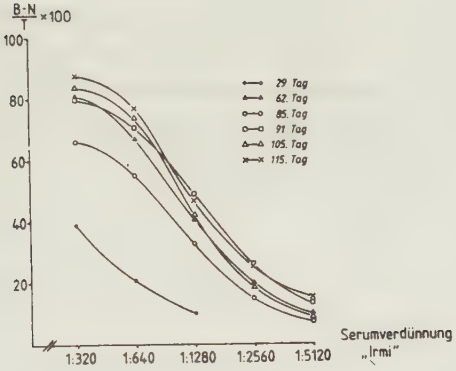


Abb 10: Spezifische Bindung von ^{125}I-hCG-α an das zu verschiedenen Zeiten nach der Immunisierung mit 50 ug hCG-α Serono entnommene Anti-hCG-α -Antiserum "Irmi".

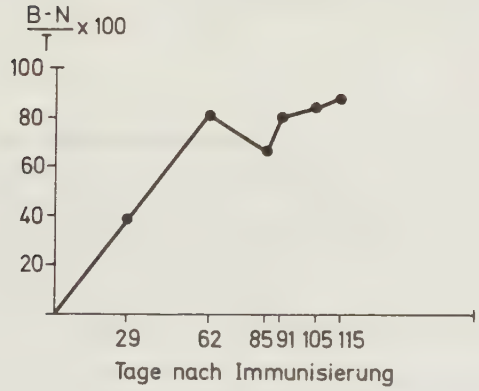


Abb. 11: Maximale spezifische Bindung von ^{125}I-hCG-α an das Anti-hCG-α -Antiserum "Irmi" nach Immunisierung.

Die zeitliche Entwicklung der maximalen spezifischen Bindung des Tracers an das Antiserum "Irmi" ist in Abb. 11 dargestellt. Das Kaninchen war, nachdem eine maximale spezifische Bindung von 88% erreicht worden war, entblutet worden, um nicht das Risiko eines Abfalls der Antikörperkonzentration einzugehen (49).

Die Entwicklung des Antikörpertiters im Serum des immunisierten Kaninchens "Irmi" wird in Abb. 12 aufgezeigt.

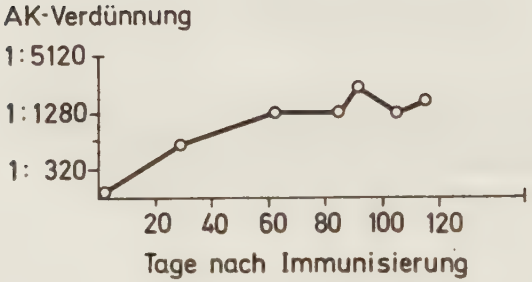


Abb. 12: Titerverlauf des Anti-hCG-α -Antiserums "Irmi" nach Immunisierung des Kaninchens mit 50 ug hCG-α Serono.

Aus Tab. 4 sind Titer, Arbeitsverdünnung und maximale Bindung an ^{125}I-hCG-α - der verschiedenen untersuchten Anti-hCG-α Antiseren zu ersehen. Die Arbeitsverdünnung der Antiseren entspricht 25 - 30% der maximalen Bindung an ^{125}I-hCG-α .

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Antiseren war der Titer des Antiserums Anti-hCG-α "Irmi" niedrig, die Höhe der maximalen Bindung an ^{125}I-hCG-α etwa gleich.

Tab. 4: Bindungscharakteristik der untersuchten gegen die alpha-Kette gerichteten Antiseren.

Antiserum	+Titer	Arbeitsverd.	++Max.Bind. an ^{125}I-hCG-α
Anti-hCG-α RSL (A)	1:1600	1:3000	90 %
Anti-TSH-α NIAMDD (C)	1:72000	1:128000	97 %
Anti-hCG-α NIAMDD (D)	1:17000	1:32000	91 %
Anti-hCG-α "Irmi"	1:1450	1:3000	88 %
Anti-hCG-α Paesel (F)	1:1400	1:2000	72 %

+ Titer definiert als 0,1 ml der Antiserumverdünnung, die der halbmaximalen Bindung an 0,1 ng ^{125}I-hCG-α entspricht.

++Bindung = B-N/T x 100 (%)

4.2.2. Lagerung der Antiseren

Unter den bei 3.2.2. genannten Lagerungsbedingungen konnte innerhalb eines Zeitraumes von ca. 1 1/2 Jahren kein Abfall des Titers festgestellt werden.

4.3. Reaktionsbedingungen

Zur Erhöhung der Sensitivität des Radioimmunoassays wurden

optimale Reaktionsbedingungen ermittelt.

4.3.1. Tracerinkubation (Abb. 13)

Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Bindung von ^{125}I-hCG-α an den Antikörper "Irmi" wurden ausgetestet. Bei beiden untersuchten Temperaturen (4°C und 21°C) war das Reaktionsgleichgewicht nach 72 Stunden erreicht. Da aber zwischen der spezifischen Bindung nach 48 Stunden und der Maximalbindung nur ein Unterschied von 6 Rel. % bei 21°C bzw. 9 Rel. % bei 4°C bestand, wurde in Hinblick auf die bessere Durchführbarkeit des Assays eine Inkubationszeit von 48 Stunden gewählt.
Da bei dieser Inkubationszeit unterschiedliche Temperaturen keinen Einfluß auf die Bindung hatten, entschieden wir uns für eine Temperatur von 4°C.

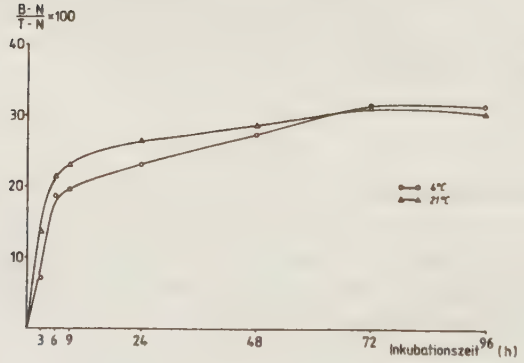


Abb. 13: Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Bindung von ^{125}I-hCG-α an das Anti-hCG-α-Antiserum "Irmi".

4.3.2. Präzipitation mit dem Doppelantikörper (Abb. 14)

Die Reaktion mit dem präzipitierenden Antiserum ist eine relativ schnell verlaufende Reaktion. Bei beiden untersuchten Temperaturen, 4°C und 21°C, war nach 8 Stunden Inkubation das Gleichgewicht erreicht und damit maximale Reaktion des Anti-kaninchenserums mit dem Antigen-Antikörper-Komplex.
Da bei einer Temperatur von 4°C die Maximalbindung höher lag als bei 21°C und nach 4 Stunden bereits 90 % der größtmöglichen Bindung erreicht wurde, führten wir unter Routinebedingungen eine Inkubation von 4 Stunden bei 4°C durch.

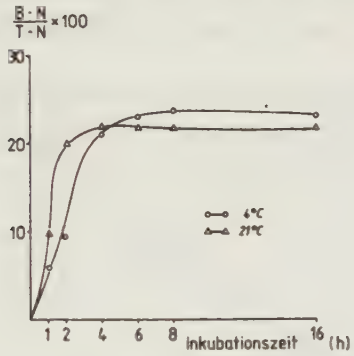


Abb. 14: Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Präzipitation des Komplexes aus ^{125}I-hCG-α und Anti-hCG-α -Antiserum "Irmi" durch Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antiserum.

4.3.3. Verhältnis der Konzentrationen von Doppelantikörper und stabilisiertem Kaninchenserum (Abb. 15)

Das Verhältnis der Konzentration des Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antiserums (Ziege) zur Konzentration des dem Tracer zur Verstärkung der Präzipitationsreaktion zugesetzten Kaninchenserums beeinflußte die Sensitivität des Assays.
So konnte nachgewiesen werden, daß die größte spezifische Bindung bei einer Verdünnung des Kaninchenserums (in Tracer) um 1:100 und des Doppelantikörpers um 1:10 bis 1:20 erreicht wurde. Dieses Verhältnis erwies sich aber als nicht praktikabel, da nur geringe Schwankungen der Antikörperverdünnung große Bindungsunterschiede bedingten. Andererseits war trotz flachen Verlaufs der Bindungskurve und damit geringer Schwankungsbreite der Antikörperkonzentration bei einer Kaninchenserumverdünnung von 1:400 die erreichte maximale spezifische Bindung relativ zu niedrig (77 Rel. %).
Gewählt wurde für Routinebedingungen eine Doppelantikörperverdünnung von 1:40 und eine Kaninchenserumverdünnung (in Tracer) von 1:300.

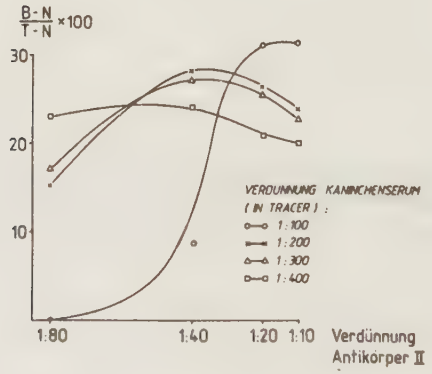


Abb. 15: Einfluß der Konzentration von Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antiserum und stabilisiertem Kaninchenserum auf die spezifische Bindung.

4.3.4. Inkubationsvolumen und Proteingehalt (Abb. 16)

In mehreren Versuchen wurde der Einfluß von Puffervolumen und Gehalt an Rinderserumalbumin auf die Empfindlichkeit der Standardverdrängungskurve untersucht. Beim Vergleich der Pufferkurven mit unterschiedlichem Gehalt an BSA (1 % bzw. 5 %) fand sich eine leichte Linksverschiebung bei größerer Proteinmenge. Eine Erhöhung des Inkubationsvolumens von 100 ul auf 300 ul Puffer führte zu einer leichten Rechtsverschiebung der Standardverdrängungskurve in den unempfindlicheren Bereich.
Unter Routinebedingungen kam ein Volumen von 300 ul Puffer mit einem Gehalt von 1 % Rinderserumalbumin zum Einsatz. Eine Steigerung der Empfindlichkeit war aber durch Verwendung von 100 ul Puffer, 5 % BSA möglich.

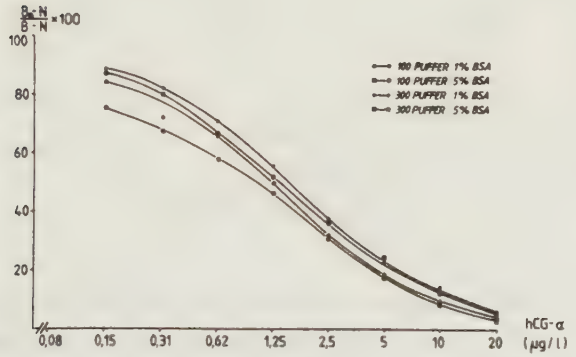


Abb. 16: Einfluß von Inkubationsvolumen und Proteingehalt auf die Standardverdrängungskurven.

4.3.5. Kalte Vorinkubation (Abb. 17)

Die Empfindlichkeit des Assays konnte durch die Technik der "kalten Vorinkubation", bei der durch verspätete Zugabe des ^{125}I-hCG-α die Bindung des unmarkierten Antigens an das Antiserum favourisiert wird, erhöht werden (17,28,38). Sowohl eine Temperaturerhöhung von 4°C auf 21°C als auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden führten zu einer Verschiebung der Standardkurve in den empfindlicheren Bereich.

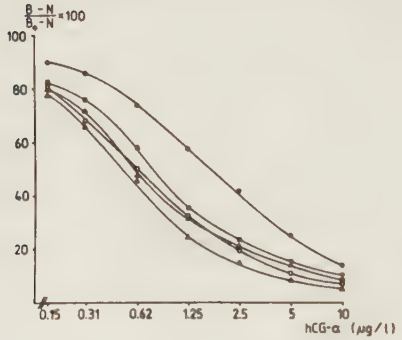


Abb. 17: Zeit- und Temperaturabhängigkeit der "kalten Vorinkubation" von hCG-α und Antiserum. o–o keine Vorinkubation, ■–■ 24 h 4°C; ▲–▲ 48 h 4°C; □–□ 24 h 21°C; Δ–Δ 48 h 21°C;

4.3.6. Empfindlichkeit des hCG- α -Radioimmunoassays

Die untere Nachweisgrenze des Assays errechnet sich aus der Streuung des Standardleerwertes, indem man die dreifache Standardabweichung des Null-Standards (B_0-Wert=100 %) abzieht und die entsprechende hCG-α Konzentration auf der Standardkurve abliest (27). Sie lag unter den angegebenen Routinebedingungen

bei 0,11 ug/l (N=35).

4.4. Methodische Ergebnisse

4.4.1. Standardverdrängungskurven

In Abb. 18 ist eine für den hCG-α RIA typische Standardverdrängungskurve in linear-logarithmischer Transformation dargestellt.

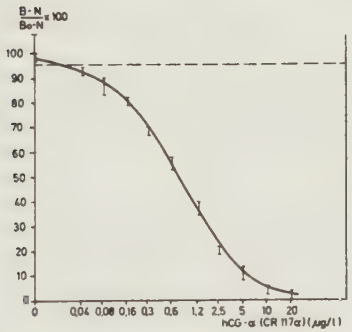


Abb. 18: Verlauf einer Standardkurve von hCG-α (CR 117α) in Puffer, mit ^{125}I-hCG-α und Anti-hCG-α-Antiserum "Irmi".
– – – – untere Nachweisgrenze

Standardkurven, deren Puffer zur Hälfte durch antigenarmes Serum oder Kälberserum ersetzt wurde, wichen nur unerheblich von Pufferkurven ab. Deshalb können hCG-α Bestimmungen im Serum an Pufferkurven abgelesen werden.

4.2.2. Kenndaten des hCG-α-Assays

In Tab. 5 sind wichtige, den hCG-α RIA kennzeichnende Daten dargestellt.

Tab. 5: Kenndaten des hCG-α-RIA ^{125}I-hCG-α , Anti-hCG-α "Irmi"

	Spezifische Bindung %	Unspez. Bindung %	Untere Nachweisgr. ug/l	50 % Intercept ug/l	Slope
N	35	35	35	35	35
$\bar{x}$	26,0	1,6	0,11	1,11	-0,974
$\pm$SD	4,9	2,0	0,14	0,48	0,099
VK (%)	18,8	122	128,5	43,5	10,2

4.4.3. Qualitätskontrolle

4.4.3.1. Präzision

Präzision kann definiert werden als die Streuung der gemessenen Werte um einen arithmetischen Mittelwert (43). Hier werden somit alle "Zufallsfehler" erfaßt. Es muß hierbei zwischen einer Streuung von Tag zu Tag und einer Streuung in der Serie unterschieden werden.

Unter dem Intraassayvariationskoeffizient (Streuung in der Serie) versteht man die Abweichung bei mehrfacher Bestimmung der gleichen Probe innerhalb eines Assays (54). Es wurde der hCG-α Gehalt eines Patientenserums (470 ug/l) in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10 - 1:4000) mit jeweils 4-6 fachen Werten in 2-4 Assays bestimmt. Es fand sich, daß bei Hormonkonzentrationen größer 2 ug/l bzw. kleiner 0,2 ug/l die Variationskoeffizienten mit ab - bzw. zunehmender Verdünnung anstiegen. In dem dazwischenliegenden

Konzentrationsbereich, also im steilsten Abschnitt der Eichkurve, erreichten sie dagegen die niedrigsten Werte von 4-1% (Abb. 19).

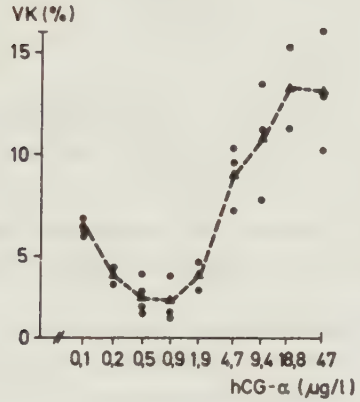


Abb. 19: Präzisionsprofil im hCG-α-RIA. Darstellung des Variationskoeffizienten in der Serie in Abhängigkeit von der Serumkonzentration.

Der Interassayvariationskoeffizient (Streuung von Tag zu Tag) errechnet sich aus der Streuung von Einzelwerten, die sich aus der Bestimmung von gleichen Proben an verschiedenen Tagen ergeben (54). In 7 aufeinanderfolgenden Assays wurde der hCG-α Gehalt dreier unterschiedlicher Serumproben bestimmt. Es ergaben sich Werte zwischen 8,7 und 18,9 % (Tab. 6).

Tab. 6: Darstellung des Variationskoeffizienten von Tag zu Tag des hCG-α -RIA.

Serumprobe	Zahl der Bestimmungen	Konzentration $\bar{x}$ (ug/l)	SD (ug/l)	Vk (%)
1	7	0,54	0,09	16,7
2	7	1,90	0,36	18,9
3	6	10,75	0,94	8,7

4.4.3.2. Richtigkeit

Unter der Richtigkeit versteht man das Maß der Annäherung des in einer Probe gemessenen Wertes an den "wahren" Wert der Probe (59). Sie kann durch Wiederfindungs- und Parallelitätstest überprüft werden.

Der Parallelitäts- oder Verdünnungstest überprüft die Linearität der Ergebnisse von verdünnten Serumproben mit hohem hCG-α Gehalt mit einer hCG-α Standardverdünnungskurve. Zu diesem Zweck wurden die Seren von Tumorpatienten und von Schwangeren verdünnt, der hCG-α Gehalt bestimmt und die Ergebnisse in logit/log Transformation gegen eine Standardverdünnungskurve aufgetragen. In beiden Fällen konnte die für exakte Messungen erforderliche Parallelität nachgewiesen werden (Abb. 20 und Abb. 21).

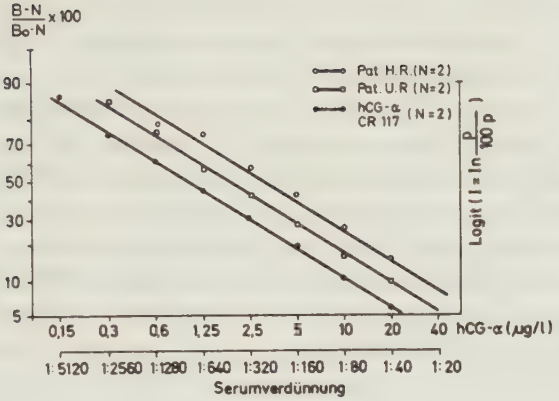


Abb. 20: Parallelitätstest. Verdünnung von Tumorpatientenseren (N = 2) von 1:40 - 1:5120. Vergleich mit einer Standardkurve von hCG-α (CR 117). Transformation nach logit/log.

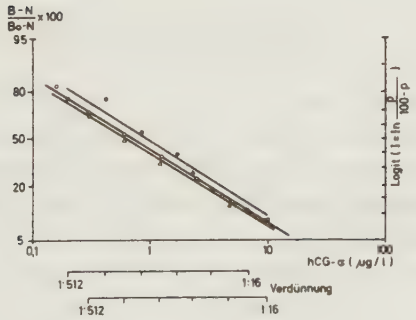


Abb. 21: Parallelitätstest. Verdünnung von Schwangerenseren (N=2) von 1:16 - 1:512 (Δ——Δ und o——o). Vergleich mit einer Standardkurve von hCG-α (CR 117), (•——•). Transformation nach logit/log.

Der Wiederfindungstest bestimmt die immunologische Identität zwischen dem zu messenden Antigen in der biologischen Flüssigkeit und dem verwendeten Standard. Zu diesem Zweck wurden einem Patientenserum mit einer mehrfach bestimmten Hormonkonzentration bestimmte Mengen von hCG-α (CR 117α) zugesetzt (in fortlaufender Verdünnung) und der Gesamtgehalt im RIA gemessen. Dies wurde dreimal durchgeführt und die Meßwerte gegen die theoretischen Werte linear aufgetragen. Es ergab sich eine Gerade, deren Steigung nur gering von der geforderten 45°-Steigung abwich (Abb. 22). Die Wiederfindung von hCG-α in Puffer betrug 97,2 ± 8,3 % ($\bar{x}$ ± SD, N=6).

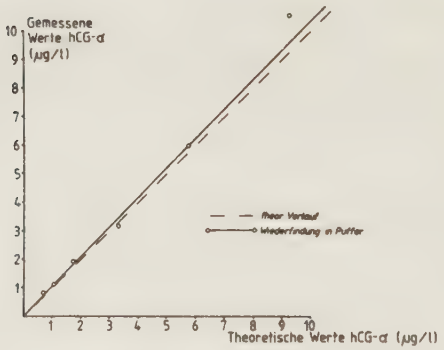


Abb. 22: Wiederfindungskurve von hCG-α (CR 117α) in Puffer. Regressionsgerade Y = 1,13x - 0,26 (o——o), Gerade mit 45° Steigung (o- -o).

4.5. Spezifität

Die Spezifität ist definiert als die Fähigkeit eines Antikörpers sein Antigen in Gegenwart von anderen Antigenen oder antigen wirkenden Substanzen zu erkennen. Bei Glykoproteinhormonen wird sie nicht nur von der Aminosäuresequenz des Proteinanteils, sondern auch von der Konformation des antigen wirksamen Moleküls bestimmt. Auch die Reinheit und Homogenität des Tracers, unspezifische Einflüsse auf die Antigen-Antikörperreaktion, so z.B. die Zerstörung des Antigens durch Jodierung und Inkubation, und Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen oder antigen wirksamen Produkten haben dabei einen gewissen Einfluß (17,28,43,59,69).

4.5.1. Unspezifische Einflüsse

Als Maß für die unspezifischen Reaktionen wurden in jedem Assay N-Werte bestimmt, Reaktionsprodukte des ^{125}I-hCG-α mit Doppelantikörper und Puffer. Diese unspezifische Bindung betrug $\bar{x}$=1,6% (SD =2,0, N = 35) der markierten Antigenmenge und wurde jedem ermittelten Wert abgezogen.

4.5.2. Kreuzreaktionen

Den entscheidenden Einfluß auf die Spezifität eines Assays haben jedoch Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen oder antigen wirksamen Produkten, die um die Bindungsstellen am Antikörper konkurrieren. Sie können verursacht werden durch Hormone verschiedener Spezies, durch Hormonabbauprodukte, - Vorläuferformen oder - Metaboliten und durch die Ähnlichkeit homologer Hormone (LH, FSH, TSH und hCG), (59,69).

4.5.2.1. Ergebnisse

Tab. 7 zeigt die Kreuzreaktionen gereinigter, hypophysärer Hormone (FSH, LH, TSH und hCG) und ihrer Untereinheiten im α - RIA bei Austestung von verschiedenen Antiseren. Eine praktisch vollständige Kreuzreaktion bestand zwischen den strukturell nahezu identischen α - Untereinheiten von LH, TSH und hCG. Dementsprechend auch, aufgrund fehlender Gemeinsamkeiten, keine oder nur sehr geringe Kreuzreaktionen mit den isolierten β-Untereinheiten dieser Hormone. Bei den LH-Präparationen erbrachte LH 68/40 mit allen ausgetesteten Antiseren die niedrigsten Kreuzreaktionen, während LH Calbiochem die relativ höchsten Werte zeigte. LH 68/40 wird aber in internationalen Einheiten angegeben (1 Ampulle mit 77 Einheiten, 11,2 ug), weshalb die Kreuzreaktion nur ungefähr geschätzt werden konnte. hCG kreuzreagierte relativ gering und mit allen Antiseren in ähnlicher Weise zwischen 4 - 8%. FSH lag zwischen 4 und 13%. Von den TSH-Präparationen wies TSH Paesel in jedem Fall die niedrigsten, TSH RP-1, NIAMDD die höchsten Werte auf.
Insgesamt erwiesen sich Antikörper "Irmi" und Paesel als die spezifischsten. Aus diesem Grund, wegen seiner mengenmäßig besseren Verfügbarkeit und seiner hohen maximalen Bindung entschieden wir uns zum Einsatz des eigenen Anti-hCG-α "Irmi" bei allen Routinebestimmungen.

Tab. 7: Kreuzreaktionen von gegen die alpha-Kette gerichteten Antiseren mit Glykoproteinhormonen und ihren Untereinheiten.

Hormone	*Kreuzreaktion in % Antiseren:				
	Anti-hCG-α ASL (A)	Anti-TSH-α NIAMDD (C)	Anti-hCG-α NIAMDD (D)	Anti-hCG-α "Irmi"	Anti-HCG-α Paesel (F)
hCG-α (CR 117 α)	100	100	100	100	100

	†Kreuzreaktion in %				
Hormone	Antiseren:				
	Anti-hCG-α RSL (A)	Anti-TSH-α NIAMDD (C)	Anti-hCG-α NIAMDD (D)	Anti-hCG-α "Irmi"	Anti-hCG-α Paesel (F)
TSH-α Calb.	89	100	85	97	69
LH-α Calb.	100	100	100	100	100
hCG (CR 115)	6,0	4,2	8,5	6,4	5,0
TSH Paesel	6,0	4,0	7,8	2,6	3,4
TSH Calb.	10,9	9,1	17,5	8,2	8,5
TSH (RP 1)	19,0	24,0	18,0	27,0	
LH 68/40	8,3	7,6	13,5	5,5	4,5
LH Biod.	11,7	11,3	13,7	7,4	6,0
LH (LER 960)	15,6	12,8	14,5	7,1	9,7
LH Calb.	16,0	14,5	13,7	6,7	6,3
FSH (HS-1)	10,3	13,1	7,7	4,2	4,2
hCG-β (CR 115B)	0	0	0	0	0
LH-β (Calb.)	0,4	0	0	0	0

†Kreuzreaktion=die Hormonmenge, die 50 % des gebundenen Tracers vom Antikörper verdrängt

4.5.2.2. Chromatographische Reinigung verschiedener Hormonpräparationen

Die Kreuzreaktionen von Antikörper "Irmi" mit LH (LER 960) und hCG (CR 115) wurden durch Gelchromatographie weiter untersucht. Das Chromatogramm von LH LER 960 auf Ultrogel-AcA-44 (Abb. 23), gemessen im LH- und hCG-α RIA, zeigte neben einem hCG-α Gipfel im Elutionsbereich von LH, Ausdruck der Kreuzreaktion, einen weiteren hCG-α Gipfel in dem für dieses Hormon typischen Bereich, was als Verunreinigung der LH-Präparation mit einem Restgehalt an α-Kette gedeutet werden mußte. Bestimmung der Kreuzreaktion mit dem Antiserum "Irmi" in den Fraktionen, in denen sich der LH-Gipfel befindet, ergab nun 1,9% gegenüber 7,1% vor Reinigung der LH-Präparation. In den die α-Kette enthaltenden Fraktionen wurden dagegen Werte bis zu 17% gemessen. Damit konnte, zumindest für LH LER 960 gezeigt werden, daß ein wesentlicher Anteil der Kreuzreaktion durch einen Restgehalt an α-Kette in der untersuchten Präparation verursacht ist.

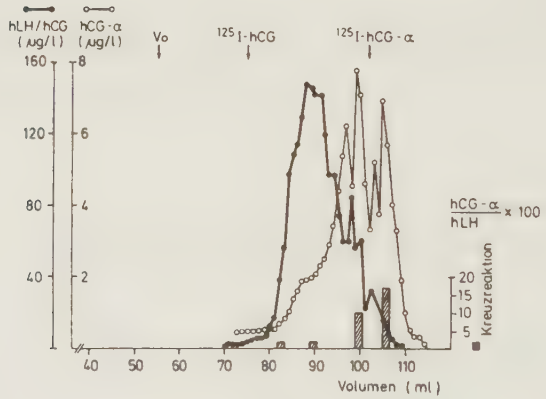


Abb. 23: Chromatographie von 1,5 ug LH LER 960 an einer Ultrogel-AcA-44-Säule (1,5 x 90 cm) und von jodiertem hCG und hCG-α . Bestimmung des Gehaltes an LH und hCG-α und Berechnung der Kreuzreaktion einzelner Fraktionen im hCG-α -RIA.

Analoge Ergebnisse konnten bei der Chromatographie von hCG (CR 115) über Ultrogel-AcA-44 und der anschließenden Messung im hCG- und hCG-α RIA erbracht werden (Abb. 24). Auch hier konnte eine restliche Verunreinigung durch die α - Untereinheit nachgewiesen werden.

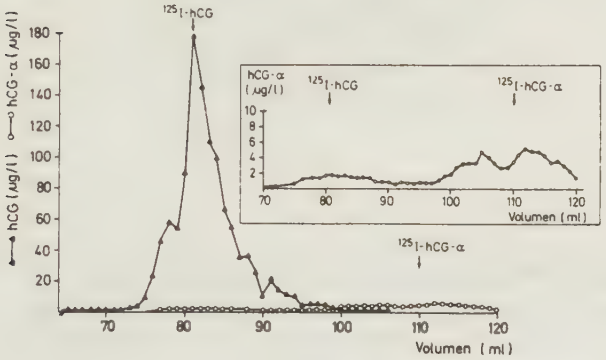


Abb. 24: Chromatographie von 1,25 ug hCG CR 115 an einer Ultrogel-AcA-44-Säule (1,5 x 90 cm) und von jodiertem hCG und hCG-α . Bestimmung des Gehaltes an hCG und hCG-α .

Die hohen Kreuzreaktionen für TSH lassen sich wahrscheinlich auch auf Verunreinigungen der Präparationen mit α - Kette zurückführen.

4.5.2.3. Vergleich der Steigung der Verdünnungskurven

Die Steigung von hCG-α , LH-α ,und TSH-α Verdünnungskurven wurde mit den entsprechenden Kurven der untersuchten kreuzreagierenden Hormone verglichen. Als Ergebnis fand sich, bei allen untersuchten Antiseren, annähernde Parallelität der in logit/log aufgetragenen Geraden zu denen der α - Kette. Dies spricht ebenfalls für die immunologische Identität des kreuzreagierenden Materials mit der α - Untereinheit (Abb. 25 - Abb. 29).

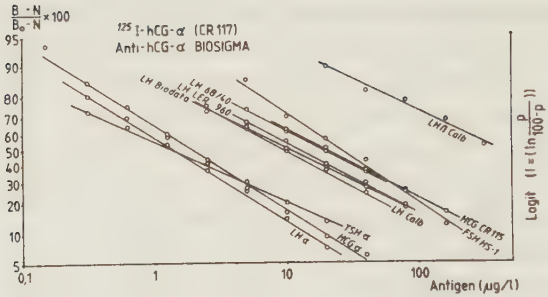


Abb. 25: Standardverdrängungskurven von hCG-α , TSH-α , LH-α und anderen kreuzreagierenden Glykoproteinhormonen im hCG-α-RIA, ^{125}I-hCG-α (CR 117α), Anti-hCG-α RSL. Transformation nach logit/log.

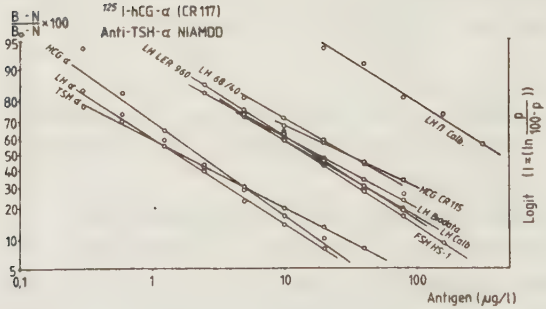


Abb. 26: Standardverdrängungskurven von hCG-α , TSH-α , LH-α und anderen kreuzreagierenden Glykoproteinhormonen im hCG-α-RIA, ^{125}I-hCG-α (CR 117α), Anti-TSH-α NIAMDD. Transformation nach logit/log.

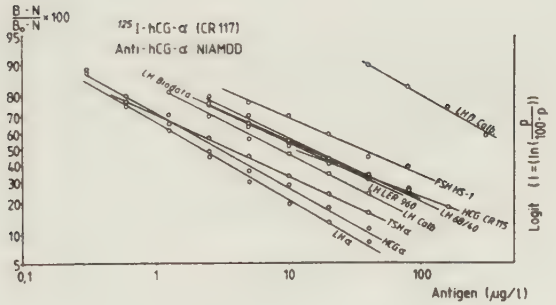


Abb. 27: Standardverdrängungskurven von hCG-α , TSH-α , LH-α und anderen kreuzreagierenden Glykoproteinhormonen im hCG-α -RIA, ^{125}I-hCG-α (CR 117 α), Anti-hCG-α NIAMDD., Transformation nach logit/log.

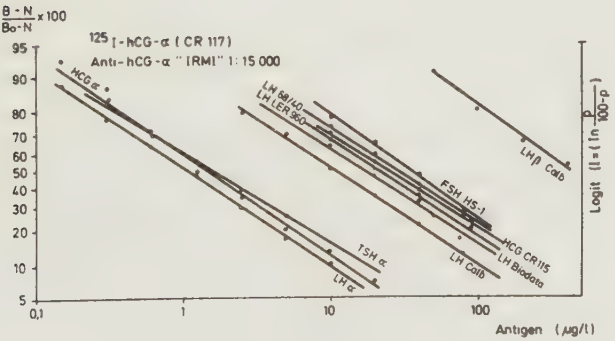


Abb. 28: Standardverdrängungskurve von hCG-α , TSH-α , LH-α und anderen kreuzreagierenden Glykoproteinhormonen im hCG-α -RIA, ^{125}I-hCG-α (CR 117 α), Anti-hCG-α "Irmi". Transformation nach logit/log.

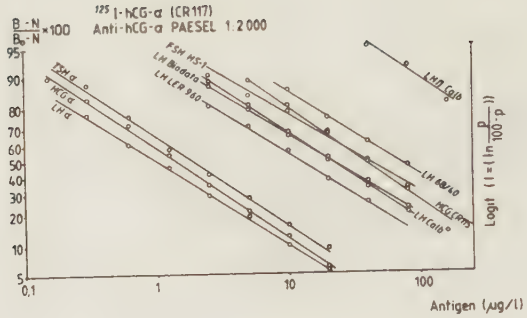


Abb. 29: Standardverdrängungskurve von hCG-α , TSH-α , LH-α und anderen kreuzreagierenden Glykoproteinhormonen im hCG-α-RIA, ^{125}I-hCG-α (CR 117 α), Anti-hCG-α Paesel. Transformation nach logit/log.

4.6. Stabilität von hCG-α im Serum

Zur Überprüfung der Stabilität von hCG-α wurden Serumproben einerseits viermal aufgetaut und wieder bei -60°C tiefgefroren andererseits vor der hCG-α Bestimmung 80, 57 und 31 Stunden lang bei einer Temperatur von 21°C aufbewahrt. In einem gemeinsamen Assay wurde dann der Hormongehalt dieser in zwei Verdünnungsstufen vorliegenden Proben bestimmt und mit dem hCG-α Gehalt einer nicht behandelten Probe verglichen.
Es fand sich, im Gegensatz zu Beobachtungen von Besser (6) für ACTH, bei zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen kein Verlust der immunologischen Aktivität (Tab. 8).

Tab. 8: Stabilität von hCG-α unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Probe	Inkubationszeit und -temperatur				4 x Auftauen
ug/l	0h/21°C	31h/21°C	57h/21°C	80h/21°C	und Tieffrieren
1	23,5	25,1	25,4	24,5	22,6
2	55,7	57,8	56,7	51,7	57,7

5. DISKUSSION

Zur radioaktiven Markierung von hCG-α wurde neben der Iodo-Gen^{TM}-Methode auch die von Greenwood und Hunter (23) erstmals beschriebene und leicht modifizierte (13,16,38) Chloramin-T-Methode angewandt.

Die spezifische Aktivität erreichte bei beiden Markierungsmethoden relativ hohe Werte (Iodo-Gen^{TM} x=162 uCi/ug, Chloramin-T x=147 uCi/ug), und konnte auch mit nur geringen Mengen an Oxidationsmitteln und niedrigen Aktivitäten sowie einer Verkürzung der Reaktionszeiten nicht entscheidend gesenkt werden. Dieser bei beiden Methoden erzielte hohe Jodierungsgrad ist nach der Literatur (1) bedingt durch die relativ große Anzahl jodierbarer Tyrosinreste im Molekül. Damit lag der Jodierungsgrad höher als, wie im allgemeinen empfohlen, 1Jodatom pro Molekül (17,69). Im Gegensatz zur Literatur aber (16,69) wurden hierdurch im Falle des ^{125}I-hCG-α Sensibilität und Stabilität nicht nachteilig beeinflußt.

Die Stabilität einer radioaktiv markierten Verbindung ist abhängig von der Radiolyse, von Proteinveränderungen, wie beispielsweise die Neigung, bei der Jodierung hochmolekulare Aggregate zu bilden, von der Abspaltung von freiem Jod und von einem allgemeinen Verlust an Immunreaktivität (17,28,69). Die Radiolyse als bedeutendster Faktor ist in erster Linie abhängig vom Jodierungsgrad (69) und damit von Markierungsbedingungen wie z.B. Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration an Oxidationsmittel (49). Auf diese Weise können radioaktiv markierte Substanzen im allgemeinen wesentlich kürzer, als es von Seiten der Halbwertszeit des ^{125}Jod möglich wäre, eingesetzt werden. Die Art der Markierung, ob mittels Chloramin-T- oder Iodo-Gen^{TM}- Methode, hatte nur unwesentlichen Einfluß auf die Stabilität und Bindungsfähigkeit des Tracers, allerdings wurde in Abweichung zu Greenwood und Hunter bei der Chloramin-T-Markierung weniger Oxidationsmittel und Jodaktivität eingesetzt. Wie Versuche von

Mann (40) an Hand von hCG zeigten, kann die Bindungsfähigkeit des Tracers an das Antiserum auch noch nach Wochen durch Affinitätschromatographie über Con-A und Reinigung von unspezifischen Degradierungsprodukten stark verbessert werden.

Die Rechromatographie des an Biogel-P-6 entsalzten Tracers erfolgte vergleichend gelchromatographisch an Ultrogel-AcA-44 oder Biogel-P-60 und affinitätschromatographisch an Con-A-Sepharose. Bei den Gelchromatographien von ^{125}I-hCG-α traten je nach verwendetem Gel ein (AcA-44) bzw. zwei (Biogel-P-60) Vorgipfel auf, die bei unmarkiertem hCG-α nicht nachzuweisen waren. Dies sprach, wie zumindest für die Chloramin-T-Methode gezeigt, für das Auftreten von höhermolekularen Degradierungsprodukten und Aggregaten (MO 70 000) die bei der Markierung entstanden waren. Die Rechromatographie dieser Verbindungen an dem Kohlehydrateinheiten bindenden Pflanzenlectin Concanavalin-A-Sepharose, auf Anregung von Dufau (12) durchgeführt, wies sie zum größten Teil als Verbindungen mit verändertem Kohlehydratanteil ohne Con-A bindende Eigenschaften und geringer Immunreaktivität aus. Die Bindung an Concanavalin-A betrug nur 10%, während nicht markiertes hCG-α zu 95% bindet. Im Einklang hiermit war auch die Bindung an Antiseren deutlich vermindert. Die ausschließliche Reinigung des ^{125}I markierten und entsalzten hCG-α durch Affinitätschromatographie über Con-A führte vergleichsweise zu einer nur unbedeutend geringeren Bindung an die untersuchten Antiseren. Dies führte uns dazu, das Entsalzen des Tracers an Biogel-P-6 und die weitere Reinigung an Con-A durchzuführen. Wir erreichten so die weitgehende Elimination der Degradierungsprodukte und die Herstellung eines strukturell annähernd intakten Tracers mit einer verbesserten Bindung an das Antiserum.

Hauptproblem der radioimmunologischen Bestimmung der α-Untereinheit ist die Herstellung eines ausreichend spezifischen Antikörpers. Bei den im allgemeinen üblichen Immunisierungstechniken, die zur Anregung der Zellproliferation, Hormon emulgiert in kompletten Freund'schen Adjuvans verwenden, kommt es zur Produktion von Antikörpern mit hohem Titer aber relativ niedriger Spezifität (17,28,49,63). Entsprechend der Angaben von Pecorelli

(46) führten wir jedoch die Immunisierung mit nur geringen Mengen an inkompletten Freund'schen Adjuvans und sterilem Mineralöl, das die vorschnelle Resorption des Immunogens durch das lymphatische System verhindern soll (59) durch. Der bei dieser Technik langanhaltende, jedoch geringe antigene Reiz führt möglicherweise zwar zu einem niedrigen Titer, gleichzeitig aber auch zu einer höheren Spezifität. Abweichend zur Literatur (17,28) wurde das Antigen streng auf eine Stelle begrenzt subcutan injiziert, wodurch eine nur langsame Freisetzung des Immunogens aus diesem Depot erreicht und dadurch ebenfalls die Immunstimulation niedrig gehalten wurde. Bei einem der immunisierten Kaninchen erreichten wir mit dieser Technik die Herstellung eines Antiserums mit einem Titer von 1:1450 und einer, im Vergleich zu allen anderen von uns untersuchten Antiseren, hohen Spezifität. Nachdem auch davon ausgegangen werden mußte, daß auch das Immunogen hCG-α nicht frei von hCG-Verunreinigungen ist (8), was die Spezifität des Antikörpers limitieren würde, verzichteten wir, im Gegensatz zur Literatur (17,28,59), auf Boosterungen. Wie Versuche an einem anderen immunisierten Kaninchen zeigten, kam es mit zunehmender Zahl der Injektionen zwar zu einem Ansteigen des Titers, gleichzeitig aber auch zu einem Absinken der Spezifität.

Die Trennung von gebundenem und freiem Tracer wurde nach der klassischen Doppelantikörpermethode (17,28,59) mit Hilfe eines selbst erzeugten Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Antiserum der Ziege (13,40) durchgeführt. Fällungsversuche mit Polyäthylenglykol (PEG) bzw. mit PEG und präzipitierendem Antiserum zusammen, von Wood (68) für andere Hormone beschrieben, bewährten sich nicht. Die Standardkurven wurden flacher und die unspezifischen Bindungen nahmen zu, sodaß der Zeitgewinn-Verlust der vierstündigen Inkubation mit dem Doppelantikörper- die Nachteile nicht aufwiegen konnte.

Über die optimalen Reaktionsbedingungen liegen in der Literatur die unterschiedlichsten Erfahrungen vor (16,17,59).
Nach unseren Untersuchungen wurde sowohl bei der Bindung des Tracers, als auch bei der Präzipitation mit dem Doppelantikör-

per das Gleichgewicht am schnellsten bei Raumtemperatur erreicht. Aufgrund eines Überwiegens der Dissoziationsgeschwindigkeit über die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Temperaturen (16) erreichte die Präzipitation bei 21°C nur noch eine im Vergleich zu 4°C etwas geringere maximale spezifische Bindung.
Um die unspezifische Adsorption von verdünntem Hormon an der Oberfläche von Reaktionsgefäßen zu vermeiden, wurden allgemein Puffer mit Zusatz von Rinderserumalbumin verwendet (13, 17,28,59). Menschliches Serumalbumin wurde wegen möglicher Verunreinigung mit α-Untereinheit nicht eingesetzt.
Die Sensitivität kann weiter beeinflußt werden durch Variation des ersten Antikörpers, der Tracerkonzentration (13), des Inkubationsvolumens (17,59), dessen Verringerung nach unseren Untersuchungen die Dosis-Wirkungskurve in den empfindlicheren Bereich verschob, und zuletzt durch die allgemein angewandte Technik der kalten Vorinkubation (16,17,28,38,59). Wir erreichten aufgrund der höheren Spezifität des Antikörpers und der Optimierung der Reaktionsbedingungen eine untere Nachweisgrenze von 0,11 ug/l, was für Bestimmungen physiologischer Serumkonzentrationen der α-Untereinheit ausreichend war.

Zur Qualitätskontrolle des Radioimmunoassays wurde der Intraassayvariationskoeffizient bestimmt, der bei Konzentrationen im steilsten Bereich der Standardkurve die niedrigsten Werte von 1-4% aufwies. Auch der Interassayvariationskoeffizient erfüllte mit Werten von 8.7, 18.9 und 16.8% je nach Hormonmenge die für RIAs gestellten Anforderungen (28).
Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde für Seren von Schwangeren und Patienten mit malignen Hodentumoren mit bekanntem Gehalt an hCG-α der Parallelitätstest und der Wiederfindungstest durchgeführt und Immunoidentität zwischen hCG-α und der zu messenden α-Kette in den Seren nachgewiesen.

Die Spezifität eines Radioimmunoassays ist nach unseren Untersuchungen zum einen von der Spezifität des Antiserums abhängig. Um sie zu erhöhen, wird von einigen Autoren die Technik der Immunabsorption durchgeführt (20,59,61,69). Während jedoch Beneviste (5) durch Immunabsorption der Anti-hCG-ß-Antikörperpo-

pulation eines Anti-hCG-Antiserums die Kreuzreaktion mit LH unter 1% senken konnte, vermochte Reuter (51,52) selbst nach Immunabsorption des Anti-hCG-α -Antiserum mit hCG nicht die Spezifität des Antikörpers "Irmi" zu erreichen. Versuche unsererseits, durch Immunabsorption eines Anti-hCG-α -Antiserums mit LH eine Steigerung der Spezifität zu erreichen, wurden aufgrund des kostspieligen und aufwendigen Verfahrens nicht weiter verfolgt. Stattdessen konnten wir durch die Anwendung einer verbesserten Immunisierungstechnik (46), durch die Verwendung einer sehr reinen, gelchromatisch überprüften hCG-α -Präparation als Immunogen und durch den Verzicht auf Boosterinjektionen, zur Verminderung des Einflusses etwaiger Kontaminationen mit hCG, ein, auch im internationalen Vergleich, relativ spezifisches Antiserum erzielen.
Wie von uns am Beispiel der Gelchromatographie von LH LER 960 und hCG CR 115 über Ultrogel AcA-44 aufgezeigt, wurde fehlende Spezifität eines Radioimmunoassays daneben auch durch Verunreinigungen der zum Vergleich verwendeten Hormonpräparationen mit α -Kette vorgetäuscht. So konnte nach Reinigung der LH LER 960 Präparation die Kreuzreaktion von 7,1 auf 1,9% gesenkt werden. Ähnliche Beobachtungen machten auch Dosogne-Guérin (11), Kourides (32) und Styne (60) bei ihren α -Assays. Auch Reuter (51) gibt für FSH und LH (Calbiochem) eine Kontamination mit α -Kette von 7% an, für hCG (Serono) und TSH (Calbiochem) von 1,2%. Auch die Tatsache, daß, in Übereinstimmung mit anderen Literaturangaben (20,61), die Standardkurven der verschiedenen von uns untersuchten Glykoproteinhormone zu denen der α -Untereinheit annähernd parallel verlaufen, spricht für die immunologische Identität des kreuzreagierenden Materials mit der α -Kette. Damit kann davon ausgegangen werden, daß, aufgrund der Verunreinigung der Hormone mit der α -Untereinheit, die für die Kreuzreaktion angegebenen Werte sicherlich nicht die wahre Spezifität der Antiseren widerspiegeln. Die Spezifität des Anti-hCG-α "Irmi" kann für klinische Fragestellungen als ausreichend gelten.
Beim Vergleich des von uns entwickelten Assays mit weiteren in der Literatur beschriebenen gegen die α -Untereinheit gerichteten RIAs (Tab. 9) zeigte sich, daß "Irmi" bezüglich LH Calbiochem (37) und LH 68/40 (25,36) eine sehr viel höhere Spezifität

aufwies. Für LH LER 960 wurden, übereinstimmend mit "Irmi", Werte von 7 - 8% (7,64), daneben aber auch von 20 und 25% (32,60) und unter 1% (5) erreicht. Aufgrund fehlender Angaben zur LH-Präparation konnten weitere Werte (9,11,31,51) nicht näher beurteilt werden. Die Kreuzreaktionen für FSH, die zwischen 1 und 16% lagen (7,9,25,32,37,51,60,64), waren an den verschiedensten Präparationen ermittelt worden. Die Angaben für hCG CR 115 lagen zwischen 2,5 und 6,4% (11,31,60,"Irmi"). Benveniste (5) erzielte nach Immunabsorption 0%. Weitere hCG-Präparationen erbrachten relativ einheitlich Werte zwischen 1 und 5% (7,9,25,32,51,64), während die Angaben zu den verschiedensten TSH Präparationen stark zwischen 1 und 20% differierten (5,7,9,32,36,51,64).
Mit der Entwicklung dieses Radioimmunoassays steht eine, insbesondere für klinische Fragestellungen, auch im internationalen Vergleich ausreichend spezifische Methode zum Nachweis der α -Untereinheit des hCG zur Verfügung. Mit seiner Hilfe gelang es, physiologische Konzentrationen von einem Patientenkollektiv mit tumorbedingten Erhöhungen von hCG-α im Serum klar abzugrenzen (40).
Die Reinheit einiger Präparationen von Glykoproteinhormonen oder deren Untereinheiten erscheint sowohl nach eigenen Untersuchungen als auch denen der Literatur als nicht ausreichend, wenn sie als Immunogen oder Referenzsubstanz für die Prüfung der Spezifität herangezogen werden sollen.
Die im allgemeinen immer noch nicht ausreichende Spezifität der hCG-α -RIA's könnte vielleicht durch folgende neue biochemisch-immunologische Techniken verbessert werden (40):
Reinigung der Hormonpräperate mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie,
Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit sehr reinen Hormonpräparationen (10),
Reinigung der Antiseren durch Affinitätschromatographie an reinen immobilisierten Antigenen,
Verwendung von chemisch veränderten Derivaten der Hormonketten als Immunogene.

Tab. 9: Spezifität von alpha-Untereinheiten-Radioimmunoassays

Assay	Jahr	Autor	Sensitivität	Kreuzreaktionen			
				LH	FSH	TSH	hCG
hCG-α	1972	Vaitukaitis et al. (64)		7% LER 960	2% LER 1366	1% Pierce	1% CR 100
hCG-α	1973	Laburthe et al. (35)		50 % Hartree	25% LER 869		
TSH-α Hennen	1975 1976	Kourides et al. (32,33)	0,5 ng/ml	20% LER 960	7% LER 1575-C	6% MCR B	2,5% Hickman
				alle Hormone 2,5-3% nach Gelfiltration an Sephadex G 100			
hCG-α	1974	Reuter et al. (51)	0,5 ng/ml	7%	7%		1,2%
TSH-α	1975	Edmonds et al. (14)		10% LER 1705	4%		
LH-α	1975	Prentice et al. (48)	0,09/tube	28% Prentice	10,4% LER 1366	10% NIAMDD	0,9% Canfield
hCG-α Hartree	1976	Hagen et al. (25)		8% MRC 68/40	1% MRC 73/519		2,5% CR 119 1% CR 115

Assay	Jahr	Autor	Sensitivität	Kreuzreaktionen			
				LH	FSH	TSH	hCG
LH-α Calbiochem	1978	Dosogne-Guerin et al. (11)	0,2 ng/ml	5% chromatographisch nachgereinigte Hormone			5%
TSH-α Calbiochem	1978	Mann et al. (37)	0,05 ng/ml	22% Calbiochem	7,9% Calbiochem		
hCG-α (SA 6) NIAMDD	1978	Rutanen (57)	0,2 ng/ml	Kreuzr. wenn LH 15 mU/ml MRC 68/40 LER 907			1,6-9,2% CR 119
hCG-α	1978	Kawamura et al. (31)	0,5 ng/ml	8%			2,5% CR 115
hCG-α	1979	Cove et al. (9)	1,5 ng/ml	11,6%	16%	20%	5%
TSH-α NIAMDD	1979	Mac Farlane et al. (36)	0,5 ng/ml	19% MRC 68/40		17% MRC 68/38	
hCG-α	1979	Braunstein et al. (7)		7,6% LER 960	2% 1801-3 12,3% 1575-6	12,3% HS-4	4% CR 117

Assay	Jahr	Autor	Sensitivität	Kreuzreaktion			
				LH	FSH	TSH	hCG
LH-α	1980	Styne et al. (60)		25% LER 960 3% nach Gelfiltr.	9% LER 869		3,5% CR 115
hCG-α CR 117 Anti-α hCG Rosen	1975	Benveniste et al. (5)		0,06% LER 960		1%	0% CR 115

6. LITERATUR

1. Bahl OP, Carlsen RB, Bellisario R, Swaminathan N (1972): Human chorionic gonadotropin: Amino acid sequence of the α and β subunits. Biochem. Biophys. Res. Comm. 48: 416–422

2. Bahl OP (1977): Human chorionic gonadotropin, its receptor and mechanism of action. Fed. Proc. 36: 2119–2127

3. Bahl OP, März L, Kessler MJ (1978): Isolation and characterization of N- and O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 84: 667–676

4. Bellisario R, Carlsen RB, Bahl OP (1973): Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the α-subunit. J. Biol. Chem. 248: 6796–6809

5. Benveniste R, Frohman LA, Bell J, Spitz I, Rabinowitz D (1975): Alpha subunit of glycoprotein hormone: Presence in peripheral serum after LHRH. Europ. J. Clin. Invest. 5: 123–131

6. Besser GM, Orth DN, Nicholson WE, Bryny RL, Abe K, Woodham JP (1971): Dissociation of the disappearance of bioactive and radioimmunoreactive ACTH from plasma in man. J. Clin. Endocrinol. 32: 595–603

7. Braunstein GD, Forsythe AB, Rasor JL, Van Scoy-Mosher MB, Thompson RW, Wade ME (1979): Serum glycoprotein hormone alpha subunit levels in patients with cancer. Cancer 44: 1644–1651

8. Catt KJ, Dufau ML, Tsuruhara T (1973):
Absence of intrinsinc biological activity in LH and hCG subunits. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 73-80

9. Cove DH, Smith SCH, Walker R, Howell A (1979):
The synthesis of the glykoprotein hormone α subunit by human breast carcinomas. Europ. J. Cancer 15: 693-702

10. Diamond BA, Dale E, Yelton BA, Scharff MD (1981):
Monoclonal antibodies. A new technology for producing serologic reagents. N. Engl. J. Med. 304: 1344-1349

11. Dosogne-Guérin M, Stolarczyk A, Borkowski A (1978):
Prospektive study of the α and B subunits of human chorionic gonadotrophin in the blood of patients with various benign and malignant conditions. Europ. J. Cancer 14: 525-532

12. Dufau ML, Tsuruhara T, Catt KJ (1972):
Interaction of glykoprotein hormones with agarose concanavalin A. Biochim. Biophys. Acta 278: 281-292

13. Eder W (1980):
Radioimmunologische Bestimmung von TSH-Untereinheiten bei Schilddrüsenerkrankungen und endokriner Ophthalmopathie. Inaugural-Dissertation, Universität München.

14. Edmonds M, Molitch M, Pierce JG, Odell WD (1975):
Secretion of alpha and beta subunits of TSH by the anterior pituitary. Clin. Endocrinol. 4: 525-530

15. Edmonds M, Molitch M, Pierce JG, Odell WD (1975):
Secretion of alpha subunits of luteinizing hormone (LH) by the anterior pituitary. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41 551-555

16. Erhardt F, Marschner I, Pickardt RC, Scriba PC (1973):
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Thyreotropin-Bestimmung. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem 9: 381-387

17. Felber JP (1974):
Radioimmunoassays. In: Clinical Biochemistry- Principles and Methods- Ed.: Curtins HC, Roth M. Verlag de Gruyter, Berlin. 324-367

18. Ferguson KM, Jeffcoate SL (1979):
The effect of purity of LH tracer on the radioimmunoassay of LH in human serum. Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl. 225: 130

19. Franchimont P, Reuter A (1972):
Evidence of α -and β-subunits of hCG in serum and urines of pregnant women. In: Margoulies M, Greenwood FC (eds): Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones, Part 2, Excerpta Medica Amsterdam 381-387

20. Franchimont P, Reuter A, Hendrick JC, Zangerle PF (1977):
Circulating forms of ectopic hormones detected by radio-immuno assay. First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, INSERM Symposium No.3, Eds. Bonfils et al., Elsvier/North Holland Biomedical Press: 95-98

21. Frieden EH (1976):
Chemical Endocrinology. Academic Press, New York, San Francisco, London

22. Good A, Ramos-Uribe M, Ryan R, Kempers R (1977):
Molecular forms of human chorionic gonadotropin in serum, urine, and placental extracts. Fertil. Steril. 28: 846-850

23. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS (1963):
The preparation of ^{131}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89: 114-123

24. Hagen C, Mc Neilly AS (1975):
The specifity and application of a radioimmunoassay for the α -subunit of luteinizing hormone in man. Acta Endocrinol. (Kbh) 78:664-674

25. Hagen C, Gilby ED, Mc Neilly AS, Ølgaard K, Bondy PK, Rees LH (1976):
Comparison of circulating glycoprotein hormones and their subunits in patients with oat cell carcinoma of the lung and uraemic patients on the chronic dialysis. Acta Endocrinol. (Kbh) 83: 26-35

26. Hellmann T (1983):
Zur Problematik der spezifischen radioimmunologischen hCG-Bestimmung. Inaugural-Dissertation der Universität München.

27. Huber W, Mann K, Karl HJ (1979):
Anwendung eines Computerprogramms zur Berechnung radioimmunologischer Meßwerte. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17: 241-246

28. Hunter WM (1973):
Radioimmunoassay. In: Handbook of experimental immunology,2 Ed: Weir DM, Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Melbourne: 14.1-14.37

29. Javadpour N, Mc Intire RK, Waldmann TA, Scardino PT, Bergman S, Anderson T (1978):
The role of the radioimmunoassay of serum alphafetoprotein and human chorionic and surgery of metastatic testicular tumors. J. Urol. 119: 759-762

30. Kahn CR, Rosen SW, Weintraub BD, Fajans SS, Gorden P (1977):
Ectopic production of chorionic gonadotropin and its subunits by islet cell tumors. A specific marker for malignancy. N. Engl. J. Med. 297: 565-569

31. Kawamura J, Machida S, Yoshida O, Oseko F, Imura H, Hattori M (1978):
Bladder carcinoma associated with ectopic production of gonadotropin. Cancer 42: 2773-2780

32. Kourides IA, Weintraub BD, Ridgway EC, Maloof F (1975):
Pituitary secretion of free alpha and beta subunit of human thyrotropin in patients with thyroid disorders. J. Clin. Endocr. 40: 872-885

33. Kourides IA, Weintraub BD, Rosen SW, Ridgway EC, Kliman B, Maloof F (1976):
Secretion of alpha subunit of glycoprotein hormones by pituitary adenomas. J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 97-106

34. Kourides IA, Weintraub BD, Re NR, Ridgway EC, Maloof F (1978):
Thyroid hormone, oestrogen and glucocorticoid effects on two different pituitary glycoprotein hormone alpha subunit pools. Clin. Endocrinol. 9: 535-542

35. Laburthe MC, Dolais JR, Rosselin GE (1973):
Evidence for circulating α subunits of pituitary gonadotropins in plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 156-159

36. Mac Farlane IA, Thatcher N, Swindell R, Beardwell CG, Hayward E, Crowther D (1979):
Serum glycoprotein hormone alpha sub-unit values and survival in metastatic melanoma patients. Europ. J. Cancer 15: 1497-1501

37. Mann K, Jansen W, Jüngst D, Karl HJ (1978):
Regulation of the TSH response and of free alpha and beta TSH subunits to TRH in patients with thyroid disorders and Graves' ophthalmopathy. Annales d'endocrinologie Abstr. 48

38. Mann K, Göring W, Lipp W, Keipert B, Karl HJ, Geiger R, Fink E (1980 a):
Radioimmunoassay of human urinary kallikrein. Determination of human urinary kallikrein, II. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18: 395-401

39. Mann K, Gilch R, Haidl P, Hellmann T, Hammerl B, Karl HJ (1980 b):
Methodological aspects on the determination of hCG and hCG subunits. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18: 733

40. Mann K (1981):
Humanes Choriongonadotropin und seine Untereinheiten bei Keimzelltumoren des Hodens. Bestimmungsmethoden und klinische Bedeutung. Habilitationsschrift, Universität München

41. Mc Queen SD, Mc Williams D, Birken S, Canfield R, Landefeld T, Boime I (1978):
Identification of mRNAs encoding the α - and B-subunits of human choriongonadotropin. J. Biol. Chem.: 7109-7114

42. Merz WE, Hilgenfeldt U, Dörner M, Brossmer R (1974):
Biological, immunological and physikal investigations on human chorionic gonadotropin. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 355: 1035-1045

43. Midgley AR, Niswender GD, Regar RW (1969):
Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specifity). Acta Endocrinol. 63: 163

44. Morgan FJ, Canfield RE (1971):
Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin. Endocrinology 88: 1045-1053

45. Morgan FJ, Birken S, Canfield RE (1975):
The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit and beta subunit. J. Biol. Chem. 250: 5247-5258

46. Pecorelli S, Gastaldi A, Faden D, Albertini A, Ghielmi S, Cessi D (1977):
La Determinazione Spezifica Dell' hCG Plasmatico. Ann. Ost. Gin. Med. Perin. 2: 97-103

47: Pierce GB, Bahl OP, Cornell JS, Swaminathan N (1971):
Biologically active hormones prepared by recombination of the α-chain of hCG and the hormone specific chain of bovine thyrotropin or of bovine luteinizing hormone. J. Biol. Chem. 246: 2321-2324

48: Prentice LG, Ryan RJ (1975):
LH and its subunits in human pituitary serum and urine. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40: 303-312

49. Raith L (1974):
Einführung in radioimmunologische Methoden. Byk-Mallinckrodt Radiopharmazeutika-Diagnostika, Dietzenbach-Steinberg

50. Reichert LE, Lawson GM, Leidenberger FL, Trowbridge CG (1973):
Influence of α and β subunits on the kinetics of formation and activity of native and hybrid molecules of LH and human chorionic gonadotropin. Endocrinology 93: 938-946

51. Reuter AM, Schoonbroodt J, Franchimont P (1974):
Specific Radioimmunoassay of hCG and its α and β subunits. Methods and results. Br. J. Cancer 30: 237-259

52. Reuter AM, Gaspard UJ, Deville JL, Vrindts-Gevaert Y, Franchimont P (1980):
Serum concentrations of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. 1. During normal singleton and twin pregnancies. Clin. Endocrinol. 13: 305-319

53. Ridgway EC, Klibanski A, Ladenson PW, Clemmons D, Beitins IZ, Mc Arthur JW, Martorana MA, Zervas NT (1981):
Pure alpha-secreting pituritary adenomas. New Engl. J. Med. 304:1254-1259

54. Rodbard D, Rayford PL, Cooper JA, Ross GT (1968):
Statistical quality control of radioimmunoassays. J. Clin. Endocrinol. 28: 1412-1418

55. Rosen SW, Weintraub BD (1974):
Ectopic production of the isolated alpha subunit of the glycoprotein hormones. New Engl. J. Med. 290: 1441-1447

56. Rosen SW, Weintraub BD, Vaitukaities JL, Sussman HH, Hershman JM, Muggia FM (1975):
Placental proteins and their subunits as tumor markers. Ann. Int. Med. 82: 71-83

57. Rutanen EM (1978):
The circulating alpha subunit of human chorionic gonadotrophin in gynaecologic tumors. Int. J. Cancer 22: 413-421

58. Sachs L (1973):
Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin,Heidelberg, New York, 4. Auflage

59. Skelley DS, Brown LP, Besch PK (1973):
Radioimmunoassay. Clin. Chem. 19:148-186

60. Styne DM, Kaplan SL, Grumbach MM (1980):
Plasma glycoprotein hormone α-subunit in the neonate and in prepubertal and pubertal children: effects of luteinizing hormone-releasing hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 50: 450-455

61. Suginami H, Robertson DM, Diczfalusy E (1978):
Influence of the purity of the iodinated tracer on the specificity of the radioimmunoassay of human luteiizing hormone. Acta Endocrinol. 89:506-520

62. Swaminathan N, Bahl OP (1971):
Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 40: 422-427

63. Vaitukaitis JL, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT (1971):
A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 988-991

64. Vaitukaitis JL, Ross GT, Reichert LE, Ward DN (1972):
Immunologic basis for within and between species cross-reactivity of luteinizing hormone. Endocrinology 91: 1337-1342

65. Vaitukaitis JL, Ross GT (1974):
Subunits of human glykoprotein hormones. Their immunological and biological behavior. Isr.J. Med. Sci. 10: 1280-1287

66. Vaitukaitis JL, Ross GT, Braunstein GD, Rayford PL (1976):
Gonadotropins and their subunits, basic and clinical studies. Recent. Prog. Horm. Res. 32: 289-331

67. Vaitukatis JL (1977):
Subunit secretion. In: VHT James (ed.) Endocrinology: 104-107, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford

68. Wood WG, Stalla G, Müller OA, Scriba PC (1979):
A rapid, novel and specific method for separation of bound and free antigen in radioimmunoassay systems.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17: 111-114

69. Yalow RS (1973):
Radioimmunoassay Methodology: Application to problems of heterogeneity of peptide hormones. Pharm. Reviews 25: 161-178

70. Yoshimoto Y, Wolfsen AR, Odell WD (1977):
Human chorionic gonadotropin-like substance in nonendocrine tissues of normal subjects. Science 197:197

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank Herrn Priv. Doz. Dr. K. Mann aussprechen, der die Anregung zu diesem Thema gab und mir jederzeit mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

Ein Dankeswort gilt auch den zuvorkommenden medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten des Forschungslabors B, Klinikum Großhadern, in besonderem Maße Frau Brigitte Hammerl.

LEBENSLAUF

22.10.1956	geboren als Tochter des Beamten Karl Gilch und seiner Ehefrau Marianne Gilch, geb. Opel, in Landshut
1963–1967	Volksschule St. Peter und Paul, Landshut
1967–1976	Sozialwissenschaftliches Gymnasium Seligenthal, Landshut
So. 1976	Abitur
Herbst 1976	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität, München
SS 1978	Ärztl. Vorprüfung
SS 1979	1. Ärztl. Prüfung
WS 1981/82	2. Ärztl. Prüfung
WS 1982/83	3. Ärztl. Prüfung
19.7.1983	Approbation
seit 1.1.1984	Assistenzärztin in der gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Vilsbiburg

seit Mai 1982 verheiratet mit Dipl. Ing. Univ. Hubert Burger